

Neue Einblicke in den Reaktionsmechanismus der  
Benzylsuccinat-Synthase



Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie  
vorgelegt von

**Deniz Seyhan**  
aus Frankfurt am Main

Marburg (Lahn) 2016

Die Untersuchungen zur vorgelegten Arbeit wurden von April 2012 – Dezember 2015 am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Johann Heider durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am \_\_\_\_\_ angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Johann Heider

Zweitgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Buckel

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2016

**Im Rahmen dieser Arbeit entstandene Publikationen:**

**Muhr, E., Schühle, K., Clermont, L., Sünwoldt, K., Kleinsorge, D., Seyhan, D., Kahnt, J., Schall, I., Cordero, P.R., Schmitt, G., Heider, J. (2015).** Enzymes of anaerobic ethylbenzene and *p*-ethylphenol catabolism in '*Aromatoleum aromaticum*': differentiation and differential induction. *Arch Microbiol* 197(9):1051-62.

**Heider, J., Szaleniec, M., Martins, B.M., Seyhan, D., Buckel, W. & Golding, B.T., (2016)** Structure and Function of Benzylsuccinate Synthase and Related Fumarate-Adding Glycyl Radical Enzymes. *J Mol Microbiol Biotechnol* 26: 29-44.

**Seyhan, D., Friedrich, P., Szaleniec, M., Hilberg, M., Buckel, W., Golding, B.T. und Heider, J., (2016)** Elucidating the Stereochemistry of Enzymatic Benzylsuccinate Synthesis with Chirally Labeled Toluene. *Angew Chem Int Ed* 55: 11664-11667.



## Inhaltsverzeichnis

I.	Zusammenfassung.....	1
II.	Summary .....	3
III.	Einleitung.....	5
	Aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffverbindungen sind überall .....	5
	Mikrobieller Abbau von Toluol – mit und ohne Sauerstoff .....	6
	Die (R)-Benzylsuccinat-Synthase aktiviert Toluol für den weiteren Abbau .....	7
	Die genaue Funktion der kleinen Untereinheiten ist noch nicht geklärt.....	9
	Das aktivierende Enzym BssD erzeugt ein Glycylradikal in BssA .....	9
	Die Strukturgene der BSS und des aktivierenden Enzyms bilden das bss-Operon.....	10
	Der Mechanismus der BSS im Detail .....	11
	Neben der BSS gibt es noch einige BSS-ähnliche-Fumarat-addierende Enzyme.....	15
	Alternative Substrate der BSS .....	17
	Weiterer Abbau des (R)-Benzylsuccinats durch $\beta$ -Oxidation.....	18
IV.	Zielsetzung dieser Arbeit.....	21
V.	Material und Methoden.....	22
	1. Chemikalien und Enzyme .....	22
	2. Mikrobiologische Methoden.....	22
	2.1 Verwendete Mikroorganismen.....	22
	2.2 Anaerobes Arbeiten .....	23
	2.3 Anzucht von Mikroorganismen.....	23
	2.4 Anzucht von Escherichia coli.....	23
	2.5 Anzucht von Thauera aromatica .....	24
	2.6 Anzucht von Aromatoleum aromaticum EbN1 und Derivate.....	25
	2.7 Antibiotika.....	27
	2.8 Transformation von Mikroorganismen.....	28
	3. Molekularbiologische Methoden .....	31
	3.1 Plasmide und Oligonukleotide .....	31
	3.2 Isolierung von chromosomaler DNA aus Aromatoleum aromaticum EbN1.....	34
	3.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli .....	34
	3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	35
	3.5 Elektrophorese von DNA.....	37
	3.6 Ligation von DNA.....	37
	3.7 Fällung von DNA.....	38
	3.8 Sequenzierung von DNA .....	38

3.9	Konzentrationsbestimmung von DNA .....	38
3.10	Herstellung von pBSS-Strep-T.aro-G.met und pASG-Strep-T.aro-G.met.....	38
3.11	Vollständige und partielle Deletion des bss-Operons .....	39
4.	Biochemische Methoden .....	40
4.1	Überproduktion von BSS in <i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1 .....	40
4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	40
4.3	Immunologischer Nachweis der BSS.....	41
4.4	Reinigung der (R)-Benzylsuccinat Synthase .....	42
4.5	Reinigung der Succinyl-CoA:Benzy succinat-CoA-Transferase (BbsEF) und der Succinyl-CoA-Dehydrogenase (BbsG).....	43
4.6	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	44
4.7	Biochemische Umwandlung von Benzy succinat zu Phenylitaconyl-CoA.....	44
5.	Analytische Methoden .....	44
5.1	Herstellung von zellfreiem Extrakt von <i>T. aromatica</i> K172 .....	44
5.2	Elektronenparamagnetische Resonanz-Spektroskopie (EPR-Spektroskopie) .....	45
5.3	Aktivitätsbestimmung der (R)-Benzylsuccinat Synthase .....	46
5.4	Reversed-phase Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC).....	46
5.5	Umsetzung von chiral markiertem Toluol .....	47
6.	Chemische Methoden .....	47
6.1	Synthese von chiralem Toluol .....	47
6.2	Chemische Synthese von Succinyl-CoA und Benzy succinyl-CoA .....	49
VI.	Ergebnisse .....	51
1.	EPR-spektroskopische Analyse von <i>Thauera aromatica</i> K172-Rohextrakt .....	51
2.	Bestimmung der BSS-Enzymaktivität mit verschiedenen Substraten.....	58
3.	Heterologe Überproduktion der Benzy succinat-Synthase in <i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1-SR7 .....	61
4.	Mutagenese der $\alpha$ -Untereinheit der Benzy succinat-Synthase .....	64
	Mutagenese des Cysteinrestes Cys493 zu Selenocystein .....	65
	Mutagenese des Argininrestes Arg508 zu Glutamin und Lysin .....	67
	Mutagenese der Isoleucinreste Ile617 und 620 zu Valin und Glutamin .....	67
5.	Vollständige und partielle Deletion des bss-Operons in <i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1-SR7 .....	71
6.	Phänotypische Charakterisierung der Mutanten $\Delta$ bssDCABEFGH und $\Delta$ bssEFGH .....	76
7.	Aufklärung der Stereochemie der enzymatischen Umsetzung von Benzy succinat mit chiralem Toluol.....	78
VII.	Diskussion.....	83
1.	Taxonomische Einordnung anaerober Toluolabbauer.....	83

## Inhaltsverzeichnis

2. Analyse zum Reaktionsmechanismus der BSS mittels EPR-Spektroskopie.....	84
3. Untersuchungen zum Substrat-Spektrum der Benzylsuccinat-Synthase.....	87
4. Heterologe Überproduktion der BSS und Mutagenesestudien .....	89
5. Aufklärung der Stereospezifität der (R)-Benzylsuccinat-Synthase .....	93
VIII. Literaturverzeichnis.....	96
IX. Abkürzungsverzeichnis.....	106
X. Anhang.....	108
XI. Danksagung .....	115
XII. Erklärung .....	116

## I. Zusammenfassung

Zusammen mit der Pyruvat-Formiat-Lyase, der anaeroben Ribonukleotid-Reduktase, der Co-Enzym B<sub>12</sub>-unabhängigen Diol-Dehydratase, der Cholintrimethylamin-Lyase und der 4-Hydroxyphenylacetat-Decarboxylase gehört die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase zur Familie der Glycylradikalenzyme.

Die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase (BSS) katalysiert die Initiierung des anaeroben Abbaus von Toluol mit einer Addition der Methylgruppe des Toluols an die Doppelbindung von Fumarat unter Bildung von (*R*)-Benzylsuccinat als Produkt der Reaktion. Sie besteht aus drei Untereinheiten mit 98, 8,5 und 6,5 kDa, die ein Heterohexamer  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$  mit einer Gesamtmasse von 220 kDa bilden. Die großen  $\alpha$ -Untereinheiten enthalten jeweils einen essentiellen Glycin- und Cysteinrest, die in allen Glycylradikal-Enzymen konserviert sind. Das aktive Zentrum des Enzyms befindet sich in der großen  $\alpha$ -Untereinheit, wobei die beiden kleinen Untereinheiten jeweils ein Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>-Cluster unbekannter Funktion beinhalten. Die  $\beta$ -Untereinheit könnte aufgrund ihrer Lage in der kürzlich aufgeklärten Struktur den Zugang des Substrats an das katalytische Zentrum der  $\alpha$ -Untereinheit regulieren.

An ihrem konservierten Glycinrest am C-Terminus der großen Untereinheit wird sie posttranslational durch das SAM-abhängige aktivierende Enzym BssD aktiviert, wobei ein freies Radikal an einem konservierten Glycin-Rest eingeführt wird und ein Glycylradikal entsteht. Die Strukturgene *bssC*, *A* und *B* sind mit dem Gen für das aktivierende Enzym *bssD* und weiteren Genen unbekannter Funktion in einem Toluol-induzierbaren Operon organisiert. Neben Toluol werden andere methylierte Kohlenwasserstoffe wie n-Alkane, Cycloalkane, *p*-Cresol, 2-Methylnaphthalin, *p*-Cymol (in *Thauera sp.* pCyN2) und Ethylbenzol durch die Anlagerung von Fumarat für den weiteren Abbauweg zu Acyl-CoA-Thioestern aktiviert. Die katalysierenden Enzyme werden als Fumarat-addierende Enzyme (FAEs) zusammengefasst.

Als katalytischer Mechanismus der Benzylsuccinat-Synthase-Reaktion wurde die Bildung eines enzymgebundenen Substratradikals aus Toluol vorgeschlagen, das anschließend mit Fumarat zu einem Produktradikal reagiert. Durch die Re-Abstrahierung eines Wasserstoffatoms vom katalytischen Cysteinrest Cys493 entsteht im nächsten Schritt das Produktradikal.



In diesem Projekt sollten weitere Informationen über den Reaktionsmechanismus der BSS mittels biochemischer und spektroskopischer Analysen erhalten werden.

Bereits in der Vergangenheit wurden durch EPR-Analysen organische Radikale als Reaktionsintermediate identifiziert, die aus verschiedenen Substratanaloga hervorgegangen sind. In dieser Arbeit wurden die EPR-spektroskopischen Analysen mit Benzylalkohol als potenten Inhibitor der BSS, die von Markus Hilberg begonnen wurden, fortgesetzt. Dabei wurden Fragen, die in der Abhandlung von Hilberg (2013) noch offen geblieben sind, beantwortet. Die eindeutige Identifizierung der neuen organischen Radikalspezies, die für die Aufklärung des Mechanismus der BSS dienlich ist, steht noch aus.

Weiterhin ist es zum ersten Mal gelungen, *in vivo* aktivierte BSS heterolog bei Inkubation mit Benzoat als Substrat überzuproduzieren und BSS-Aktivität im Rohextrakt nachzuweisen.

Es sollte die Rolle wichtiger Aminosäuren, die das katalytische Zentrum der BSS bilden, in Bezug auf die Substratspezifität, die Enantiospezifität und den generellen Katalysemechanismus des Enzyms aufgeklärt werden. Es wurden mehrere Aminosäuren in der Nähe des katalytischen Zentrums der  $\alpha$ -Untereinheit der BSS mutiert, um das entsprechende Enzym in *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 SR7 überzuproduzieren. Mit den erhaltenen Enzymaktivitäten der Extrakte sollten die Enzymaktivitäten und die Nutzung verschiedener Substrate jeweils im Vergleich zum Wildtyp-Enzym analysiert werden.

Um gänzlich auszuschließen, dass eine gemessene Aktivität auf das Wildtypenzym zurückzuführen ist und um die Rolle der unbekannten Gene *bssEFGH* aufzuklären, wurde das *bss*-Operon vollständig (*bssDCABEFGH*) und partiell (*bssEFGH*) erfolgreich deletiert.

Durch Verwendung von chiralem radioaktiv markiertem (*R*)-und (*S*)-Toluol mit je einem der drei verschiedenen Wasserstoffisotope an der Methylgruppe ist es in dieser Arbeit gelungen, die Stereospezifität der Benzylsuccinat-Synthase aufzuklären.

Bei einer Reaktion dieser Substrate mit Fumarat kommt es an der Methylgruppe des Toluols zu einer Inversion der Konfiguration.

## II. Summary

The enzymes pyruvate formate lyase, anaerobic ribonucleotide reductase, the coenzyme B<sub>12</sub> independent diol dehydratase, the choline trimethylamine lyase, and the 4-hydroxyphenylacetate decarboxylase are members of the glycyl radical enzyme family.

The (*R*)-benzylsuccinate synthase (BSS) catalyzes the initiation of the anaerobic toluene degradation, adding the methyl group of toluene to the double bond of fumarate forming (*R*)-benzylsuccinate as product of the reaction. The holoenzyme consists of three subunits  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  with molecular masses of 98, 8.5, and 6.5 kDa, respectively, composing a heterohexamer ( $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ ) with a total molecular mass of 220 kDa. The two  $\alpha$  subunits each contain an essential glycine and cysteine residue, which are conserved in all glycyl radical enzymes. The catalytic center of the enzyme is located in the  $\alpha$  subunit, whereas the two smaller subunits both contain one Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> cluster with unknown function. Due to its position in a recently solved crystal structure of the enzyme in *Thauera aromatica* T1, the  $\beta$  subunit could regulate the substrate access to the catalytic center of the  $\alpha$  subunit.

The BSS is post-translationally activated by a SAM-dependent activating enzyme BssD, inserting a free radical into the conserved glycine residue in the C-terminal domain of the alpha subunit forming the glycyl radical. The structural genes *bssC*, *A*, and *B* and the gene *bssD* are organized in a toluene-inducible operon together with further genes of unknown function. Besides toluene other methylated carbohydrates, e.g. n-alkanes, cycloalkanes, *p*-cresol, 2-methylnaphthalene, *p*-cymene (in *Thauera sp.* pCyN2), and ethylbenzene, are activated for the subsequent degradation to acyl CoA thioesters through the addition of fumarate. The catalyzing enzymes are consolidated as fumarate-adding enzymes (FAEs).

For the catalytic mechanism of the BSS the formation of an enzyme bound substrate radical was proposed, which reacts with fumarate to a product radical. Subsequently, the product radical abstracts a hydrogen atom from the catalytic cysteine residue Cys493, generating benzylsuccinate as the final product of the reaction.

In this project further information about the reaction mechanism of the BSS should be gained via biochemical and spectroscopic analyses.

Prior to this study, organic radicals could be identified as reaction intermediates by EPR analyses, resulting from different substrate analogs. In this work EPR analyses with the potent BSS inhibitor benzyl alcohol started by Markus Hilberg were continued, giving answers to questions that could not be answered in the thesis of Hilberg (2013). Yet the unambiguous identification of the new organic radical species, that will provide information about the reaction mechanism is still pending.

Moreover, it has succeeded in overproducing *in vivo* activated BSS heterologously under benzoate degrading conditions and in detecting activity in the crude extract.

Putatively important amino acids in the catalytic center of BSS might have a crucial function in substrate specificity, enantiomeric specificity and the general reaction mechanism. For this purpose, several amino acids in close proximity to the putative catalytic center of the  $\alpha$  subunit of BSS have been mutated to overproduce the respective enzymes in *Aromatoleum aromaticum* EbN1 SR7. The obtained enzyme activity in the crude extracts and different substrate usage should be analyzed in comparison to the wild type.

To completely exclude activity from the wild type gene products and to clarify the unknown roles of *bssEFGH*, the *bss* operon was successfully deleted entirely ( $\Delta bssDCABEFGH$ ) and partially ( $\Delta bssEFGH$ ).

Using chiral radiolabeled (*R*)-und (*S*)-toluene with one of the three hydrogen isotopes at the methyl group the 'cryptic stereospecificity' of the benzylsuccinate synthases could be solved as both of the two enantiomers react with fumarate in an inversion of configuration at the methyl group of toluene.

### III. Einleitung

Aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffverbindungen sind überall

Aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe und andere aromatische Verbindungen stellen auf der Erde die größte Gruppe kleiner organischer Verbindungen dar und sind in anaeroben Gefilden wie in Böden und marinen Sedimenten allgegenwärtig.

Nicht zu unterschätzen ist ihr Wert als natürliche Ressource für Energiegewinnung und die chemische Industrie. Durch die zunehmende industrielle Nutzung fossiler Brennstoffe führte die Lagerung und der Transport von Mineralölkohlenwasserstoffen in der Vergangenheit häufig zu Unfällen und damit zu einer enormen Verschmutzung von Grundwasser und Ozeanen. Beim wohl bekanntesten Zwischenfall der jüngsten Vergangenheit, der gesunkenen Ölplattform ‚*Deepwater Horizon*‘, gelangten bis zu 636 Millionen Liter Rohöl in die Umwelt (Camilli *et al.*, 2010). Doch auch durch die Verwendung von Insektiziden und Pflanzenschutzmitteln und durch die Ausschüttung von Abfallprodukten aus der Industrie kommt es zur Belastung der Umwelt.

Aufgrund ihrer relativ hohen Wasserlöslichkeit, Stabilität und Toxizität im Vergleich zu Alkanen, ist es umso wichtiger, den langwierigen Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen zu verstehen. Gleichzeitig richtet der ungewollte Abbau aromatischer Kohlenwasserstoffe in Ölreservoirs wirtschaftlichen Schaden für den Betreiber an, sodass auch dieser Aspekt bei der Aufklärung ihrer Abbauewege nicht zu vernachlässigen ist.

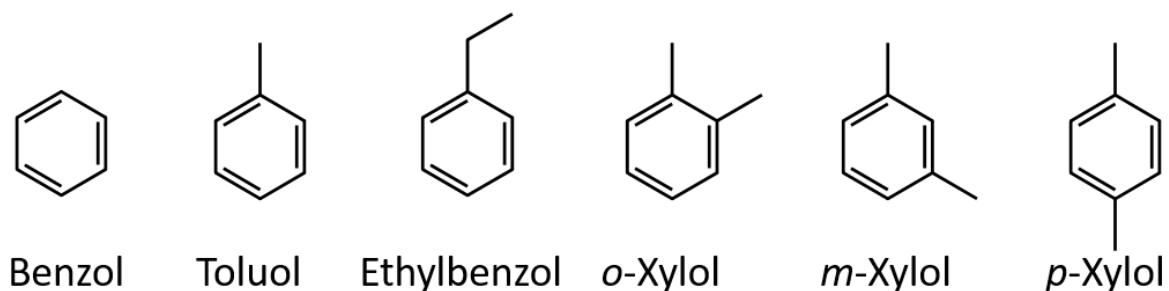
Die ausschließlich aus Kohlenstoff- und Wasserstoffatomen bestehenden Kohlenwasserstoffe werden in die Untergruppen Aliphate, Alicyclen und Aromaten eingeteilt. Von Aliphaten spricht man bei linearen oder verzweigten, gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoffen wie n-Hexan oder 2-Methylpentan. Alicyclen, wie z.B. Cyclohexan, weisen eine ringförmige Struktur auf, haben aber anders als aromatische Kohlenwasserstoffe kein vollständig konjugiertes  $\pi$ -Elektronensystem.

Für die Einstufung einer Verbindung als aromatische Verbindung, wie Benzol, muss sie mindestens ein Ringsystem mit delokalisiertem Elektronensystem aufweisen. Die Elektronenzahl dieses Systems muss mit konjugierten Doppelbindungen, freien Elektronen oder unbesetzten p-Orbitalen der Hückel-Regel mit der Formel  $(4n + 2)$  delokalisierten Elektronen entsprechen. Bezüglich aromatischer Kohlenwasserstoffverbindungen müssen alle

Kohlenstoffatome des Rings in einem  $sp^2$ -hybridisierten Zustand vorliegen, was zur planaren Struktur dieser Verbindungen führt. Aromatische Verbindungen werden zudem unterteilt in monozyklische (wie Benzol und Toluol) und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffverbindungen (wie Naphtalin), die aus mindestens zwei aneinanderhängenden Benzolringen bestehen.

### Mikrobieller Abbau von Toluol – mit und ohne Sauerstoff

Toluol gehört neben Benzol, Ethylbenzol und den drei Xylol-Isomeren (*ortho*-, *meta*- und *para*-Xylol) zur industriell häufig verwendeten Gruppe der BTEX-Kohlenwasserstoffe (Abb.1). Es wird als Lösemittel zu Farbstoffen, Harzen und Lacken zugesetzt und kann durch Nitrierung mit einer Mischung aus rauchender Salpeter- und rauchender Schwefelsäure (der Nitriersäure) zum explosiven 2, 4 ,6-Trinitrotoluol (TNT) umgewandelt werden (Wilbrand, 1863).



**Abbildung 1:** Mitglieder der BTEX-Gruppe. Die Abkürzung BTEX steht für Benzol, Toluol, Ethylbenzol und die 3 Isomere des Xylols *o*-Xylol, *m*-Xylol und *p*-Xylol.

Aufgrund der Stabilität des aromatischen Rings und der damit verbundenen Reaktionsträgheit werden BTEX-Kohlenwasserstoffe als gesundheits- und umweltgefährdend eingestuft. Benzol reagiert im menschlichen Körper über ein karzinogenes Epoxid-Intermediat (Lovern *et al.*, 2001). Toluol wird hauptsächlich zu Benzoesäure oxidiert, in der Niere zu Hippursäure umgesetzt und über den Harn ausgeschieden, schädigt aber dennoch Nerven, Nieren und Leber (Cohr & Stokholm, 1979).

Aerob lebende Mikroorganismen können den Abbau von Toluol mithilfe von Mono- oder Dioxygenasen unter Verwendung molekularen Sauerstoffs initiieren. Durch diese Enzyme werden ein oder zwei Sauerstoffatome in Form von Hydroxylgruppen in die Methylgruppe

oder den aromatischen Ring eingebaut und das Toluol für den weiteren Abbau zugänglich gemacht.

Der anaerobe Abbau ohne molekularen Sauerstoff zur Aktivierung des aromatischen Rings stellt Mikroorganismen vor eine biochemische Herausforderung. Lange wurde angenommen, dass der anaerobe Abbau von Kohlenwasserstoffen nicht möglich ist. Gerade aufgrund ihres enormen Aufkommens in anaeroben Sedimenten ist der anaerobe Abbau von Kohlenwasserstoffen für einen funktionierenden Kohlenstoffkreislauf aber unabdingbar. Umso überraschter waren Forschungsgruppen in den späten Achtziger- bis frühen Neunziger Jahren des 20. Jahrhunderts über die Entdeckung anaeroben Kohlenwasserstoffabbaus durch Mikroorganismen (Aeckersberg *et al.*, 1991, Dolfig *et al.*, 1990, Rabus *et al.*, 1993, Vogel & Grbic-Galic, 1986, Zeyer *et al.*, 1986). Das Wissen über sauerstoffunabhängige Abbauewege einer ganzen Reihe von Kohlenwasserstoffen nahm seitdem in den letzten 20 Jahren enorm zu.

Gerade für den anaeroben Abbau von Toluol wurde eine Vielzahl von Initiationsreaktionen vorgeschlagen (Altenschmidt & Fuchs, 1991, Evans *et al.*, 1991, Evans *et al.*, 1992, Frazer *et al.*, 1995, Seyfried *et al.*, 1994, Zeyer *et al.*, 1986), bis es 1996/1997 mit der Entdeckung von Benzylsuccinat als Produkt einer Anlagerung von Fumarat an die Methylgruppe von Toluol zum Durchbruch kam (Biegert *et al.*, 1996, Beller & Spormann, 1997b, Beller & Spormann, 1997a). Hier wurde zum ersten Mal klar, dass Benzylsuccinat, welches im Überstand von auf Toluol wachsenden Zellen gefunden wurde, eben kein Sackgassenprodukt war, wie dies lange Zeit angenommen wurde, weil es das Wachstum der bekannten Toluol-abbauenden Organismen nicht unterstützte (Beller *et al.*, 1992, Evans *et al.*, 1992, Frazer *et al.*, 1995, Seyfried *et al.*, 1994).

Zwei Jahre nach der Entdeckung von Benzylsuccinat als tatsächliches Intermediat des Toluolabbauweges konnte nachgewiesen werden, dass ausschließlich stereospezifisch (*R*)-Benzylsuccinat gebildet wird (Beller & Spormann, 1998, Leutwein & Heider, 1999).

### **Die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase aktiviert Toluol für den weiteren Abbau**

Die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase (BSS) wurde zum ersten Mal aus den  $\beta$ -Proteobakterien *Thauera aromatica* und *Azoarcus sp.* T gereinigt und charakterisiert (Beller & Spormann, 1999,

Leuthner *et al.*, 1998). Sie katalysiert unter anaeroben Bedingungen die Addition von Fumarat an die Methylgruppe von Toluol, wobei spezifisch (*R*)-Benzylsuccinat entsteht.

Die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase besteht aus drei Untereinheiten mit 98, 8,5 und 6,5 kDa, die ein Heterohexamer  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$  mit einer Gesamtmasse von 220 kDa bilden (Funk *et al.*, 2014).

Die Sequenz der großen Untereinheit weist bemerkenswerte Ähnlichkeit zu den katalytischen Untereinheiten anderer Glycylradikalenzyme auf. Ein konservierter Glycinrest (Gly829) nahe des C-Terminus scheint an der Erzeugung und Aufrechterhaltung des Glycylradikals beteiligt zu sein. Die Anwesenheit eines Glycylradikals im aktivierten Enzym konnte durch EPR-Experimente mit Zellextrakten aus auf Toluol gewachsenen Zellen gezeigt werden (Krieger *et al.*, 2001, Verfürth *et al.*, 2004). Zur Zeit ihrer Entdeckung (Beller & Spormann, 1999, Leuthner *et al.*, 1998) war die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase das dritte Glycylradikalenzym neben der Pyruvat-Formiat-Lyase und der anaeroben Ribonukleotid-Reduktase (Eklund & Fontecave, 1999, Reichard, 1997). Inzwischen sind mit der Co-Enzym B<sub>12</sub>-unabhängigen Diol-Dehydratase aus *Clostridium butyricum*, der Cholintrimethylamin-Lyase und der 4-Hydroxyphenylacetat-Decarboxylase aus *Clostridium difficile* drei weitere Typen von Glycylradikalenzymen bekannter Funktion gefunden worden (O'Brien *et al.*, 2004, Raynaud *et al.*, 2003, Craciun & Balskus, 2012, Craciun *et al.*, 2014, Selmer & Andrei, 2001).

Vergleiche mit Glycylradikalen in der Pyruvat-Formiat-Lyase oder der anaeroben Ribonukleotid-Reduktase durch Hochfeld-EPR-Experimente bestätigten ihre Existenz als eigenständige Glycylradikale. Wie in anderen Glycylradikalenzymen kommt es auch bei der BSS bei Kontakt mit Sauerstoff zur sofortigen und irreversiblen Inaktivierung, die durch die oxygenolytische Spaltung der großen Untereinheit nahe des Glycylradikals hervorgerufen wird (Leuthner *et al.*, 1998). Sichtbar wird dies als deutlich erkennbare Doppelbande im SDS-Polyacrylamidgel (Beller & Spormann, 1999, Leuthner *et al.*, 1998). Dieses für alle Glycylradikalenzyme typische Verhalten wurde als Nachweis für Aktivierung nur einer der Untereinheiten im dimeren Komplex zum Glycylradikalenzym gesehen. (Knappe & Sawers, 1990, Leuthner *et al.*, 1998).

Ein räumlich nicht weit vom Glycinrest Gly829 entfernter konservierter Cysteinrest Cys493 spielt als Thiylradikal möglicherweise bei der Reaktion in allen Glycylradikalenzymen eine Schlüsselrolle (Coschigano *et al.*, 1998, Leuthner *et al.*, 1998, Selmer *et al.*, 2005).

## Die genaue Funktion der kleinen Untereinheiten ist noch nicht geklärt

Mit ihren zusätzlichen beiden Untereinheiten weist die BSS gegenüber anderen Formiat-addierenden Enzymen ein Alleinstellungsmerkmal auf. Lediglich die 4-Hydroxyphenylacetat-Decarboxylase besitzt eine zusätzliche kleine Untereinheit (Selmer & Andrei, 2001, Selmer *et al.*, 2005).

Beide kleine Untereinheiten der BSS beinhalten  $\text{Fe}_4\text{S}_4$ -Cluster mit besonders niedrigem Redoxpotential unbekannter Funktion (Funk *et al.*, 2014, Hilberg *et al.*, 2011, Li *et al.*, 2009). Allerdings tragen sie damit sehr wahrscheinlich zur ohnehin schon hohen Sauerstoffempfindlichkeit des BSS-Enzyms auch in nicht aktivierter Form bei. Auch die einzige kleine Untereinheit der 4-Hydroxyphenylacetat-Decarboxylase trägt zwei  $\text{Fe}_4\text{S}_4$ -Cluster, wobei auch hier die Funktion unbekannt ist.

Die von Funk *et al.* (2014) veröffentlichte Röntgenkristallstruktur der BSS bestätigte die heterohexamere  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ -Zusammensetzung der BSS und die  $\text{Fe}_4\text{S}_4$ -Cluster, ligiert von vier konservierten Cysteinresten in den kleinen Untereinheiten, die strukturell der Anordnung in Eisenproteinen mit hohem Potential ähneln. Die kleinen Untereinheiten scheinen dabei an der Oberfläche des Proteins und damit weit entfernt vom katalytischen Zentrum lokalisiert zu sein, wobei der  $\beta$ -Untereinheit eine Aufgabe in der Kontrolle des Substratzugangs zum aktiven Zentrum zugesprochen wurde.

## Das aktivierende Enzym BssD erzeugt ein Glycylradikal in BssA

Die posttranslationale Aktivierung der BSS setzt die Anwesenheit eines zusätzlichen aktivierenden Proteins BssD voraus, welches wie in allen anderen Fumarat-addierenden Enzymen gemeinsam mit den drei Untereinheiten der BSS im *bss*-Operon kodiert ist (Achong *et al.*, 2001, Coschigano *et al.*, 1998, Kube *et al.*, 2004, Leuthner *et al.*, 1998, Leuthner & Heider, 1998).

BssD weist starke Ähnlichkeit zu den anderen Aktivierungsenzymen der Glycylradikalenzyme auf und gehört zur Familie der S-Adenosylmethionin-abhängigen Radikalenzyme (Sofia *et al.*, 2001). Wie die aktivierenden Enzyme der 4-Hydroxyphenylacetat-Decarboxylase und den meisten anderen Glycylradikalenzymen unterscheidet es sich von den zuvor bekannten aktivierenden Enzymen der Pyruvat-Formiat-Lyase und der anaeroben Ribonukleotid-Reduktase durch eine zusätzliche Domäne, die zwei zusätzliche Ferredoxin-ähnliche  $\text{Fe}_4\text{S}_4$ -Cluster unbekannter Funktion beinhaltet (Leuthner *et al.*, 1998, Selmer *et al.*, 2005).

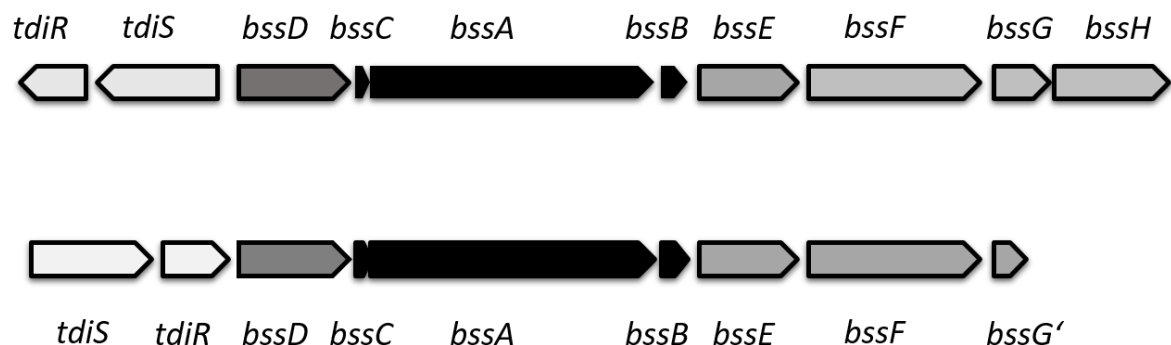


Wie in allen aktivierenden Enzymen wird das Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>-Cluster ungewöhnlicherweise von einem Cysteinmotiv aus nur drei konservierten Cysteinresten koordiniert. Dadurch bleibt die vierte Koordinationsstelle des Clusters unbesetzt und dient der Bindung des Kosubstrats S-Adenosylmethionin (SAM), welches zur Generierung eines Radikals verwendet wird. Dabei wird ein Elektron vom Eisen-Schwefel-Cluster auf das Kosubstrat SAM übertragen, sodass dieses unter Bildung eines S-Adenosylradikals und Methionin homolytisch gespalten wird. Das S-Adenosylradikal wird verwendet, um das Glycylradikal im aktiven Zentrum der BSS zu erzeugen.

Die Strukturgene der BSS und des aktivierenden Enzyms bilden das *bss*-Operon

Das Gen *bssD* für das aktivierende Enzym BssD ist gemeinsam mit den Strukturgenen der BSS *bssCAB* und bis zu 4 weiteren Genen unbekannter Funktion in einem gemeinsamen Operon, dem *bss*-Operon untergebracht (Abb. 2) (Achong *et al.*, 2001, Aklujkar *et al.*, 2009, Coschigano *et al.*, 1998, Kube *et al.*, 2004, Leuthner *et al.*, 1998, Hermuth *et al.*, 2002).

#### *Aromatoleum aromaticum* EbN1



#### *Thauera aromatica* K172

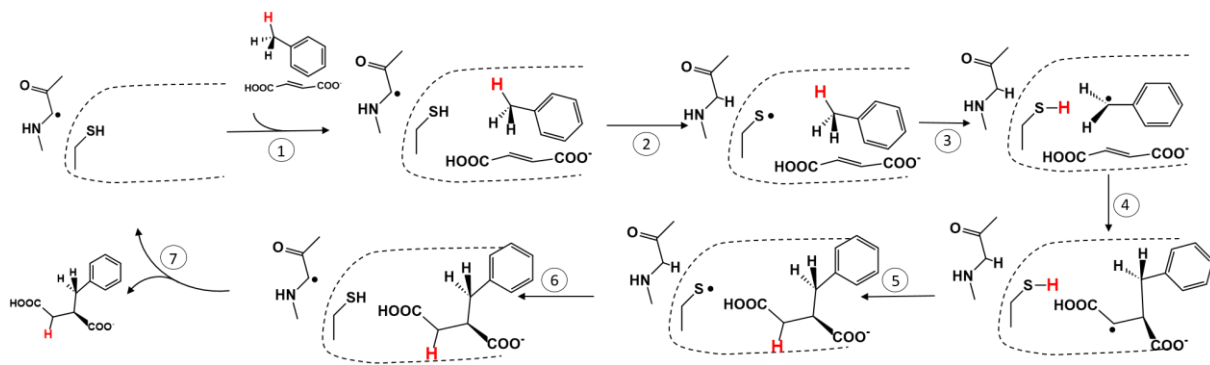
**Abbildung 2:** Die Strukturgene der BSS, *bssC*, *bssA* und *bssB* sind zusammen mit dem Gen *bssD* für das aktivierende Protein BssD und den Genen *bssE*, *F*, *G* und *H* in einem Operon zusammengefasst, welches wahrscheinlich durch das Zweikomponenten-System TdiRS, kodiert durch *tdiS* und *tdiR*, reguliert wird. Im vollständig sequenzierten Stamm *Aromatoleum aromaticum* EbN1 findet man im Gegensatz zum partiell sequenzierten Stamm *Thauera aromatica* K172 das zusätzliche *bssH*-Gen, dessen Funktion genauso wie die der Gene *bssE*, *bssF* und *bssG* unklar ist.

Transkriptionsstudien zeigten, dass die gebildete mRNA nicht nur die Strukturgene der BSS *bssCAB* beinhaltet, sondern auch die Gene *bssE-H* transkribiert werden (Hermuth *et al.*, 2002, Kube *et al.*, 2004). Die Aminosäuresequenz von BssE weist unter anderem Ähnlichkeiten mit einer ATP-bindenden Enzymklasse auf. Mit NorQ, einem Chaperon aus *Paracoccus halodenitrificans* besteht eine Aminosäuresequenzähnlichkeit von 29 %. Bei *bssH* wird angenommen, dass es möglicherweise für ein membranständiges Transportprotein, zuständig für den Toluolefflux, kodieren könnte, um toxische Toluolkonzentrationen in der Zelle zu vermeiden (Kube *et al.*, 2004).

Gemeinsam mit dem *bbs*-Operon, welches für die Proteine kodiert, die für den weiteren Abbau des Benzylsuccinats notwendig sind, wird das *bss*-Operon ausschließlich unter anaeroben Bedingungen bei der Anwesenheit von Toluol induziert (Achong *et al.*, 2001, Coschigano, 2000, Hermuth *et al.*, 2002, Kube *et al.*, 2004, Kühner *et al.*, 2005). Die Regulation dieser Expression erfolgt sehr wahrscheinlich über ein Zweikomponenten-System TdiSR (*,toluene degradation inducer'*). Die für diese zwei Proteine kodierenden Gene befinden sich in allen charakterisierten denitrifizierenden Bakterien direkt stromaufwärts vom *bss*-Operon (Achong *et al.*, 2001, Coschigano & Young, 1997, Heider & Rabus, 2008, Kube *et al.*, 2004, Leuthner & Heider, 1998, Rabus *et al.*, 2005). In strikt anaeroben Toluolabbauern wie *Geobacter metallireducens* wird die Expression dieser Gene wahrscheinlich über einen XylR-ähnlichen Regulator induziert (Aklujkar *et al.*, 2009, Butler *et al.*, 2007).

## Der Mechanismus der BSS im Detail

Durch die relative Stabilität von Glycylradikalen unter anaeroben Bedingungen (Buckel & Golding, 2006, Knappe & Sawers, 1990) und aufgrund der Entfernung zum putativen aktiven Zentrum (Funk *et al.*, 2014) wird angenommen, dass das auf dem Glycinrest Gly829 lokalisierte Radikal lediglich eine niedrigreaktive Übergangsform des aktivierten Enzyms darstellt, bis sich beide Substrate im katalytischen Zentrum befinden, wobei monoprotoniertes Fumarat als erstes bindet und die thermodynamisch günstige pro-(*R*)-Orientierung einnimmt (Funk *et al.*, 2015, Szaleniec & Heider, 2016). Nach der anschließenden Bindung des Toluols macht das Enzym möglicherweise eine Strukturänderung durch, die das aktive Zentrum verschließt (Funk *et al.*, 2014), sodass alle weiteren Schritte der Katalyse in einer geschlossenen Tasche stattfinden, um die hochreaktiven Intermediate, die bei der Reaktion entstehen, vom umgebenden Medium abzuschotten und ungewollte Reaktionen zu verhindern.



**Abbildung 3:** Hypothetischer BSS-Mechanismus. Die gestrichelten Linien deuten das aktive Zentrum des Enzyms mit Bindestellen für Fumarat und Toluol an. 1: Von den beiden Substraten bindet zunächst monoprotoniertes Fumarat in pro-(*R*)-Orientierung und anschließend Toluol. 2: Sobald die Substrate gebunden haben, wird das Radikal vom Glycinrest Gly829 auf den Cysteinrest Cys493 übertragen. 3: Das entstandene Thiylradikal abstrahiert ein Wasserstoffatom von der Methylgruppe des Toluols zur Erzeugung eines Benzylradikals. 4: Das Benzylradikal addiert an die Doppelbindung von Fumarat, wobei thermodynamischen Berechnungen zu Folge das distale C3-Atom (aus Sicht des Cysteinrestes) bevorzugt wird. 5: Das zuvor abstrahierte Wasserstoffatom wird in einer *syn*-Addition an das proximale C2-Atom addiert. 6: Bevor sich das aktive Zentrum öffnet, um (*R*)-Benzylsuccinat freizusetzen, wird das Radikal vom Cysteinrest zurück auf den Glycinrest übertragen. 7: Mit der Freisetzung von (*R*)-Benzylsuccinat ist das Enzym frei für den nächsten Zyklus.

Unter anderem aufgrund der räumlichen Entfernung des Glycinrests vom putativen aktiven Zentrum des Enzyms wird angenommen, dass das Radikal zunächst vom Glycinrest auf ein in allen Glycylradikalenzymen (Funk *et al.*, 2014) nah liegendes Cystein übertragen wird, sodass ein Thiylradikal entsteht (Abb. 3). Dieses neu gebildete Thiylradikal nimmt nun tatsächlich an der Reaktion teil, indem es unter der Bildung eines Benzylradikalintermediats ein Wasserstoffatom von der Methylgruppe des Toluols abstrahiert. Dieses Benzylradikal addiert an das in Bezug auf den Cysteinrest distale C3-Atom des Fumarats unter Bildung eines Benzylsuccinylradikals (Abb. 3) (Bharadwaj *et al.*, 2013, Szaleniec & Heider, 2016). An dieser Stelle der Reaktion wird das Wasserstoffatom vom Cys493 re-abstrahiert und in einer *syn*-Addition an das proximale C2-Atom des Fumarats angeheftet (Szaleniec & Heider, 2016, Qiao & Marsh, 2005), sodass es zur Bildung von ausschließlich (*R*)-Benzylsuccinat (Beller & Spormann, 1998, Leutwein & Heider, 1999) und der Regenerierung des Thiylradikals kommt (Abb. 3). Bevor sich das aktive Zentrum des Enzyms öffnet, wird das Radikal zurück auf den

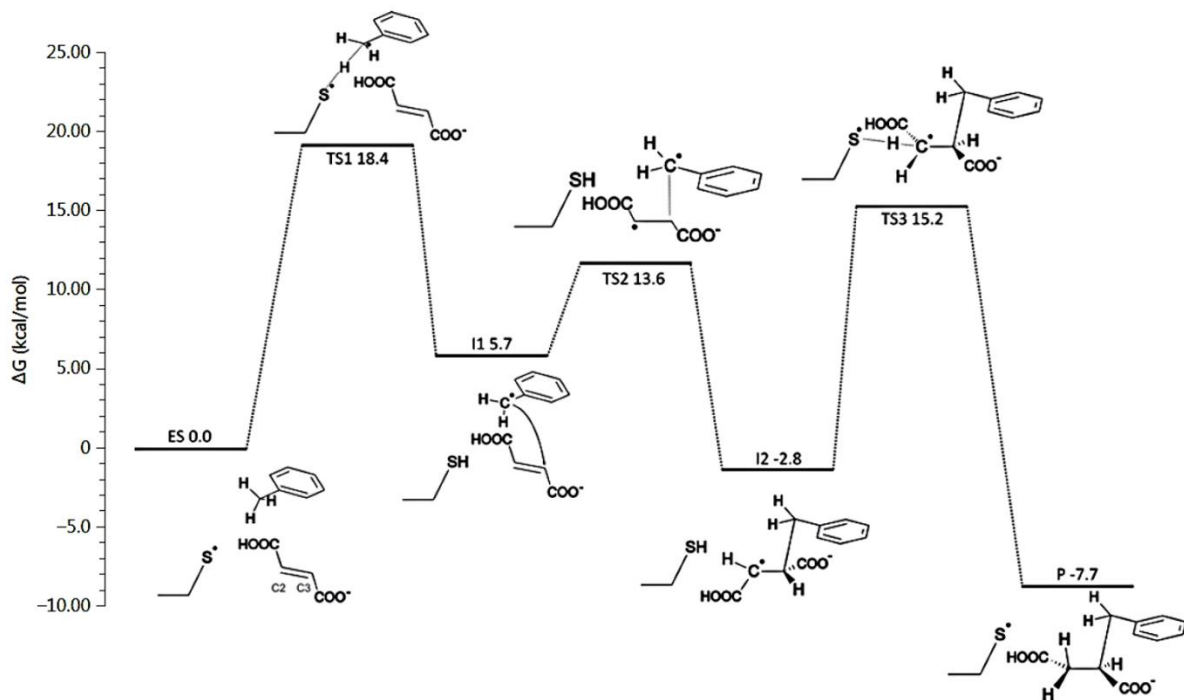
Glycinrest übertragen. (*R*)-Benzylsuccinat wird freigesetzt und das Enzym ist frei für das nächste Substrat/Kosubstrat-Paar.

Beller und Spormann konnten mithilfe von markiertem Toluol zeigen, dass, wie in Abb. 3 illustriert, das eingangs der Reaktion von der Methylgruppe des Toluols abstrahierte Wasserstoffatom im Produkt Benzylsuccinat wiedergefunden werden kann (Beller & Spormann, 1999). Auch die DFT-Berechnungen von Himo bestätigten generell die Plausibilität des geschilderten Mechanismus mit dem Angriff des Thiylradikals an die Methylgruppe, der Bildung einer C-C-Bindung und der Auflösung des Benzylsuccinylradikals durch Re-Abstrahierung des Wasserstoffatoms vom Cysteinrest Cys493 (Himo, 2002, Himo, 2005).

Signifikante Unterschiede zu Studien von Himo konnten 2016 von Szaleniec und Heider in Bezug auf die relativen Höhen der energetischen Barrieren zu den einzelnen Schritten des Reaktionsmechanismus ausgemacht werden (Szaleniec & Heider, 2016), sodass nach DFT-Modelling-Daten, die auf der Kristallstruktur von Funk *et al.* (2015) basieren, nicht mehr davon ausgegangen wird, dass die Bildung der C-C-Bindung (TS2 in Abb. 4, TS3 bei Himo, 2002) der limitierende Schritt ist. Stattdessen legen die neuen Daten nahe, dass die Umsatzrate hauptsächlich durch die CH-Aktivierung (TS1 in Abb. 4, TS2 bei Himo, 2002) reguliert wird und dass die berechneten Energiebarrieren von TS1 und TS2 Unterschiede von 4,8 kcal/mol aufweisen (Abb. 4). Auch der Schritt der Re-Abstrahierung des Wasserstoffs vom Cys493-SH, dem Himo (2002) ein vergleichsweise geringes Energieniveau zuordnete, ist energetisch aufwendiger als die Addition des Benzylradikals an Fumarat (15,2 vs. 13,6 kcal/mol, Abb. 4) (Szaleniec & Heider, 2016).

Verfürth postulierte in seiner Dissertation einen alternativen Mechanismus der BSS-Reaktion, bei dem das Thiyl-Radikal zuerst mit der Doppelbindung des Fumarats zu einem enzymgebundenen Intermediat reagiert, welches anschließend mit Toluol zu einem Benzylradikal und enzymgebundenem Succinat umgesetzt wird. Der finale Schritt des postulierten Reaktionswegs beinhaltet die Aufspaltung der Enzym-Fumarat-Bindung unter Bildung des Produkts. Szaleniec und Heider konnten jedoch durch DFT-Modelling-Daten die Bildung eines Fumarat-Radikals aus thermodynamischer Sicht ausschließen, da dieses aufgrund seiner mangelnden Stabilität sofort zerfallen würde (Szaleniec & Heider, 2016). Stattdessen zeigen die Daten von Szaleniec und Heider und alle anderen Daten der jüngeren Vergangenheit, dass die Abstrahierung eines Wasserstoffatoms mit der Bildung eines

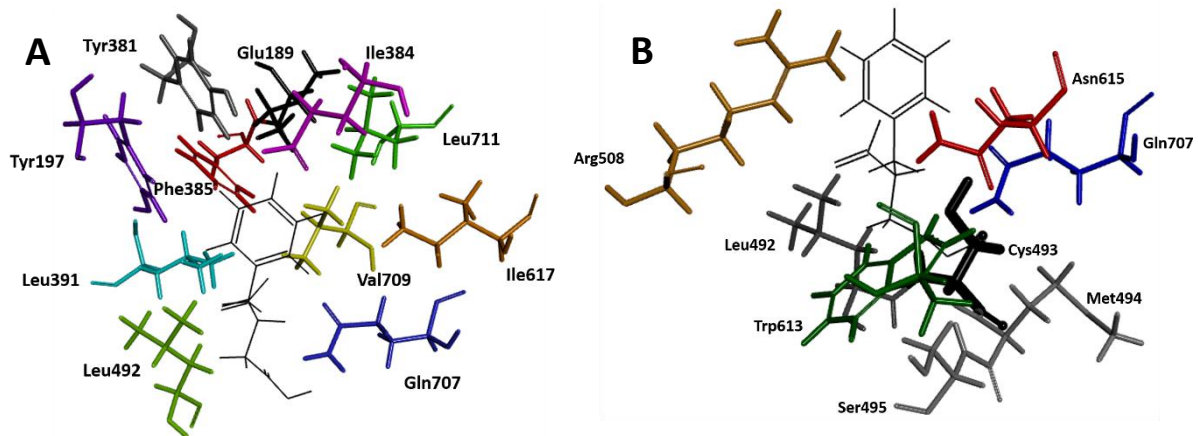
Benzyllradikals und der anschließenden Addition an die Doppelbindung von Fumarat den wahrscheinlichsten Mechanismus darstellt.



**Abbildung 4:** DFT-Modell der Gibbs freien Enthalpie für den Reaktionsmechanismus der BSS aus (Heider *et al.*, 2016). Ausgehend vom Enzym-Substrat-Komplex (ES) kommt es durch die Aktivierung von Toluol durch das Thiylradikal über das erste Übergangsstadium (*transition state*) TS1 zum Stadium I1 (Intermediat 1), der Bildung des Benzyllradikalintermediats. Über den Angriff des distalen C3-Atoms des Fumarats als Übergangsstadium 2 TS2 kommt es mit der Bildung der C-C-Bindung zwischen Benzyllradikal und Fumarat zum Stadium I2, dem Benzyllsuccinyl-Radikal. Die dritte Energiebarriere stellt mit dem Übergangsstadium TS3 die Auslöschung des Benzyllsuccinyl-Radikals durch Abstrahlung des Wasserstoffatoms von der Cys493-SH-Gruppe dar, sodass es zur Bildung des Enzym-Produkt-Komplexes P mit gebundenem Benzyllsuccinat kommt. Die Gesamtreaktion ist mit -7,7 kcal/mol exergon.

Kürzlich wurden durch Bharadwaj *et al.* (2013), Funk *et al.* (2015) und Szaleniec & Heider (2016) Aminosäuren identifiziert, die möglicherweise am Reaktionsmechanismus der BSS eine Schlüsselrolle spielen, indem sie entweder durch hydrophobe Interaktion für die korrekte Positionierung des Toluols sorgen oder durch Wasserstoffbrückenbindung die Positionierung und Fixierung des Fumarats bewerkstelligen (Abb. 5). Docking-Studien basierend auf der von Funk *et al.* (2014) veröffentlichten Kristallstruktur legen die Bindung der Carboxylgruppe des Fumarats durch den positiv geladenen Argininrest Arg508 nahe. Auf der anderen Seite des putativen aktiven Zentrums der BSS wurde eine Reihe von hydrophoben Aminosäuren identifiziert, die eine Rolle in der Bindung von Toluol spielen könnten. Quantenmechanische

Clustermodelle deuten auf 9 Aminosäurereste im putativen Zentrum hin, die die gebundenen Substrate umschließen: Glu189, Tyr197, Ser199, Ile384, Leu391, Leu492, Cys493, Arg508 und Val709 (Abb. 5).



**Abbildung 5:** Modelle des Aktivitätszentrums der BSS mit enthaltenem Benzylsuccinat, berechnet durch Maciej Szaleniec, optisch modifiziert für diese Arbeit. **A:** Aminosäuren, die durch ihre unpolaren Eigenschaften als wahrscheinliche Kandidaten für die korrekte Positionierung und Bindung von Toluol angesehen werden. **B:** Aminosäuren, die durch ihre polaren Eigenschaften für die Positionierung und Bindung von Fumarat in Frage kommen. Berechnete elektrostatische und Wasserstoffbrücken-basierte Interaktionsenergien: Arg508 (-11,94 kcal/mol), Tyr197 (-3,16 kcal/mol), Trp613 (-2,52 kcal/mol), Gln707 (-0,85 kcal/mol), Cys493 (-0,25 kcal/mol); Berechnete van-der-Waals-basierte Interaktionen: Ile384 (-2,39 kcal/mol), Leu492 (-2,34 kcal/mol), Leu391 (-1,45 kcal/mol), Val709 (-1,99 kcal/mol), Leu711 (-1,90 kcal/mol).

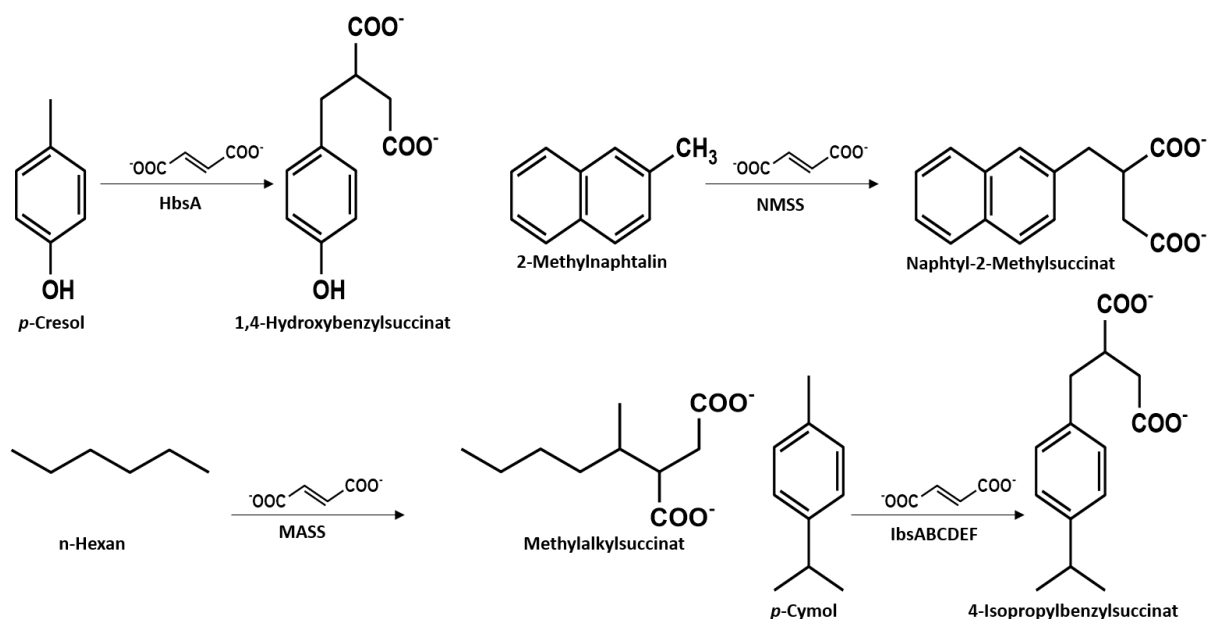
## Neben der BSS gibt es noch einige BSS-ähnliche-Fumarat-addierende Enzyme

Neben der Benzylsuccinat-Synthase gibt es eine ganze Serie von ähnlichen Enzymen, die den Abbau von Kohlenwasserstoffen, darunter Alkane bzw. Alkyl-aromatische Kohlenwasserstoffe zu Acyl-CoA-Thioestern, durch die Addition von Fumarat initiieren.

Mit Ausnahme der kürzlich beschriebenen Hydroxylierung der Methylgruppe von *p*-Cymol durch eine Molybdän-haltige Hydroxylase (Strijkstra *et al.*, 2014) beinhalten alle bisher bekannten anaeroben Abbauwege von Toluol und anderer methylierter Kohlenwasserstoffe die Anlagerung an die Doppelbindung von Fumarat als initiale Reaktion. Substrate sind dabei *n*-Alkane, Cycloalkane, *p*-Cresol, 2-Methylnaphthalin, *p*-Cymol und Ethylbenzol (Callaghan *et al.*, 2006, Kniemeyer *et al.*, 2003, Kniemeyer *et al.*, 2007, Musat *et al.*, 2009, Rabus *et al.*, 2001, Selesi *et al.*, 2009, Strijkstra *et al.*, 2014, Wöhlbrand *et al.*, 2013, Jaekel *et al.*, 2015)

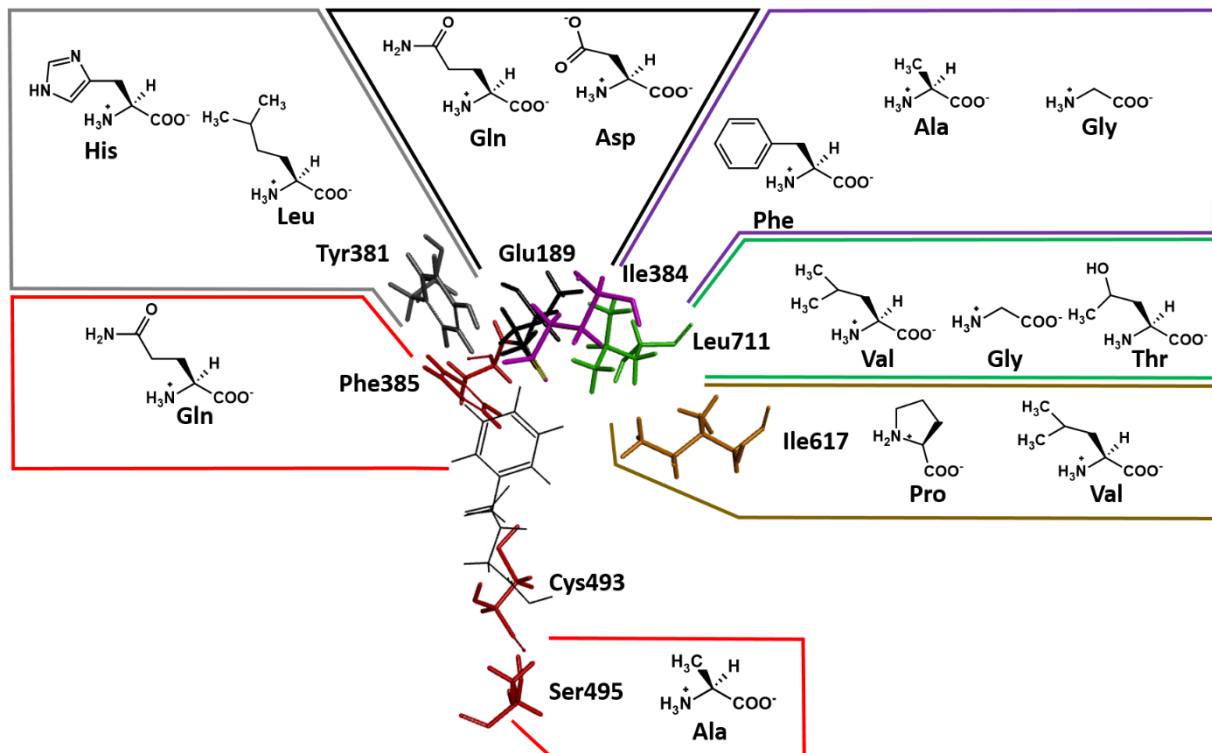
Dabei sind anaerobe Toluol-abbauende Mikroorganismen in vielen physiologischen Gruppen vertreten, besonders bei denitrifizierenden Bakterien, Metall-Ion- und sulfatreduzierenden Spezies, einer phototrophen (Zengler *et al.*, 1999) und mehreren syntrophen protonenreduzierenden Bakterien in methanogener Anreicherungskultur, die häufig zur Gattung *Desulfosporosinus* gehören (Cupples, 2011, Fowler *et al.*, 2014).

Wie spezifisch dabei die hydrophoben Aminosäuren für die Bindung von Toluol offenbar sind, zeigt sich zum einen beim Vergleich von Sequenzen der  $\alpha$ -Untereinheit der BSS von *Thauera aromatica* K172 mit anderen nah verwandten Stämmen, deren Enzyme neben Toluol noch andere, größere Substrate akzeptieren (Anhang, Abb. 31). Zum anderen zeigen Sequenzvergleiche der  $\alpha$ -Untereinheit der BSS mit den katalytischen Untereinheiten der 4-Hydroxy-Benzylsuccinat-Synthase (HBSS), 2-Methyl-Naphthylsuccinat-Synthase (MNSS), 4-Isopropylbenzylsuccinat-Synthase (IbsABCDE) und 1-Methylalkylsuccinat-Synthase (MASS), die ebenfalls eine Addition an ein Fumaratmolekül an andere Substrate als Toluol katalysieren (Abb. 6), Veränderungen in den als toluolspezifisch identifizierten Aminosäuren (Anhang Abb. 34 und Abb. 7). Dabei wird deutlich, dass offenbar durch Ersetzen dieser Aminosäuren durch andere, teilweise kleinere Reste die Bindetasche entsprechend verändert wird (Abb. 7), um die jeweils größeren Substrate, wie *p*-Cymol, Methylnaphtalin oder *p*-Cresol zu akzeptieren und umzusetzen (Abb. 6).



**Abbildung 6:** Umsatzreaktionen der Glycyrradikelenzyme 4-Hydroxy-Benzylsuccinat-Synthase (HBSS), 2-Methyl-Naphthylsuccinat-Synthase (MNSS), 4-Isopropylbenzylsuccinat-Synthase (IbsABCDE) und 1-

Methylalkylsuccinat-Synthase (MASS), die Sequenzähnlichkeiten zur Benzylsuccinat-Synthase aufweisen (IbsABCDEF 72 %, HbsA 54 %, MNSS 49 %, MASS 35 %) und Fumarat an Aryl-oder Alkylverbindungen addieren.



**Abbildung 7:** Mögliche Schlüsselaminosäuren, die bei BSS-verwandten Enzymen verändert sind. In IBSS sind die Reste Leu711 und Ile384 zu Valin bzw. Alanin verändert. In HBSS sind die Reste Tyr381 zu Leucin, Ile384 zu Phenylalanin, Glu189 zu Glutamin, Leu711 zu Glycin verändert. In MNSS sind die Reste Glu189 zu Aspartat, Ile384 zu Glycin, Phe385 zu Glutamin, Leu711 zu Threonin, Ile617 zu Prolin, Ser495 zu Alanin und Tyr381 zu Histidin, verändert. Aufgrund der umfangreichen Umstrukturierung der putativen Substratbindetasche der MASS, bei der eine Vielzahl von Aminosäureresten im Vergleich zur BSS verändert ist, kann hier nicht auf einzelne Reste eingegangen werden.

## Alternative Substrate der BSS

Interessanterweise akzeptieren auch BSS-Enzyme aus unterschiedlichen Stämmen eine ganze Reihe von Toluolanaloge, wie z.B. Fluortoluol (Biegert *et al.*, 1996), *o*-Xylol (Beller & Spormann, 1997b), die drei Cresol-Isomere (Verfürth *et al.*, 2004) und *o*-Toluidin (Lippert und Heider, unveröffentlicht). Oft sind diese Umsetzungen auch mit Wachstum auf analogen Substraten verbunden, wie es für *m*-Xylol im genannten *Azoarcus sp.* T oder für *m*-Cresol in *Desulfobacterium cetonicum* und *Thauera aromatica* S100 der Fall ist (Mechichi *et al.*, 2002, Müller *et al.*, 1999). Die Fähigkeit des Wachstums mit diesen Substraten hängt



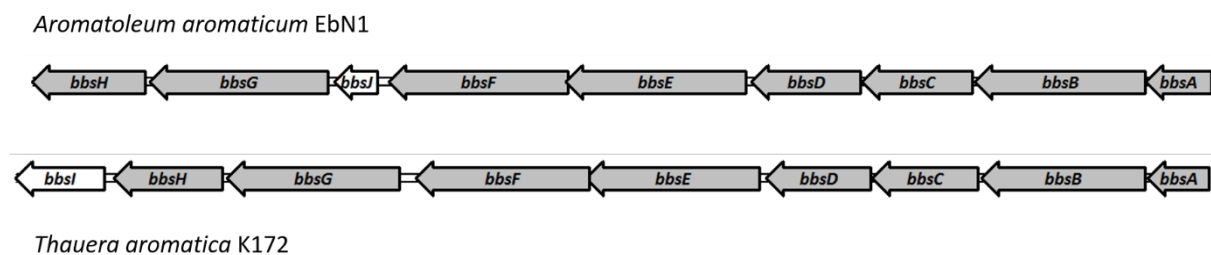
höchstwahrscheinlich vor allem davon ab, ob die jeweilig entstehenden Produkte weiterverarbeitet werden können (Bozinovski *et al.*, 2014, Juárez *et al.*, 2013).

Die Xylol-Isomere zeigen zwischen verschiedenen Stämmen eine Sonderstellung. So setzt *T. aromatica* K172 keines der drei Isomere um, während *Azoarcus sp.* T alle drei Isomere zum jeweiligen Succinataddukt umsetzt (Krieger *et al.*, 1999, Verfürth *et al.*, 2004).

Dagegen kann Fumarat nur teilweise durch z.B. Maleat ersetzt werden (Beller & Spormann, 1997a, Biegert *et al.*, 1996, Li & Marsh, 2006), wobei unklar ist, ob Maleat tatsächlich an der Reaktion mit Toluol beteiligt ist oder lediglich durch eine Hemmung der Fumarase den Fumaratspiegel im Zellextrakt erhöht.

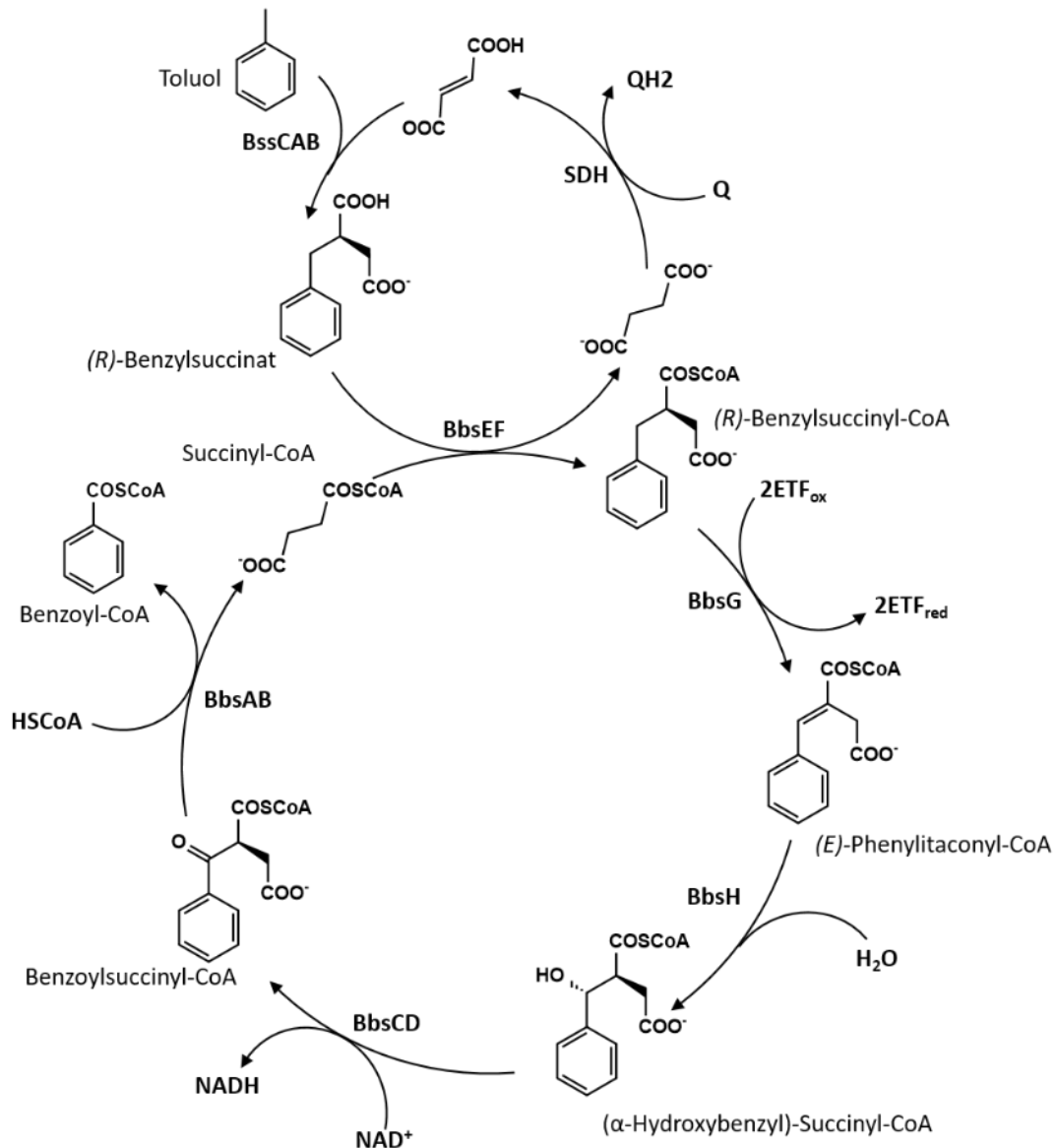
### Weiterer Abbau des (*R*)-Benzylsuccinats durch $\beta$ -Oxidation

Der weitere Abbau von Benzylsuccinat erfolgt über  $\beta$ -Oxidation. Die Enzyme dieses Abbauweges sind allesamt in einem Toluol-induzierten *bbs*-Operon (Abb. 8) (für **B**eta-Oxidation von **B**enzylsuccinat) kodiert (Leuthner & Heider, 2000, Kube *et al.*, 2004).



**Abbildung 8:** Das Toluol-induzierte *bbs*-Operon in den beiden Stämmen *A. aromaticum* EbN1 und *T. aromatica* K172. In *A. aromaticum* EbN1 findet sich ein mit *bbsI* bezeichnetes Gen, welches für ein hypothetisches Protein kodiert. Dagegen verfügt *A. aromaticum* EbN1 nicht über das *bbsI*-Gen, wie es in *T. aromatica* K172 zu finden ist. Die Funktion beider Gene und ihrer Produkte ist ungeklärt.

Der Abbauweg (Abb. 9) beginnt mit der regio- und enantiomerspezifischen Aktivierung des Benzylsuccinats zum CoA-Thioester 2-(*R*)-Benzylsuccinyl-CoA durch die aus zwei Untereinheiten bestehende und durch die beiden Gene *bbsE* und *bbsF* kodierte CoA-Transferase (BbsEF) (Leuthner & Heider, 2000, Leutwein & Heider, 1999, Leutwein & Heider, 2001). Benzylsuccinyl-CoA wird anschließend durch die flavinhaltige Benzylsuccinyl-CoA-Dehydrogenase (BbsG) zu (*E*)-Phenylitaconyl-CoA oxidiert (Leutwein & Heider, 2002). Durch die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA-Hydratase folgt im nächsten Schritt eine Hydratisierung von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA zu (2-Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA.



**Abbildung 9:** Initiierung des Abbaus von Toluol durch die Benzylsuccinat-Synthase mit anschließender  $\beta$ -Oxidation von Benzylsuccinat in *T. aromatica* (nach Hilberg, 2012, modifiziert). Der initiale Schritt beim anaeroben Abbau von Toluol in *T. aromatica*, die Bildung von (*R*)-Benzylsuccinat, wird durch die (*R*)-Benzylsuccinatsynthase (BssCAB) katalysiert. Die Succinyl-CoA:Benzy succinat-CoA-Transferase (BbsEF) bildet anschließend mit Succinyl-CoA unter Bildung von Succinat den CoA-Thioester (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA, der durch die Benzylsuccinyl-CoA-Dehydrogenase (BbsG) oxidiert und durch die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA-Hydratase (BbsH) hydratisiert wird. Die 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA-Dehydrogenase (BbsCD) oxidiert die Alkoholgruppe unter Bildung von Benzoylsuccinyl-CoA zur Ketogruppe. Die Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase (BbsAB) spaltet die eine Thioesterbindung unter Bildung einer neuen, sodass Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA entstehen und ein neuer Zyklus beginnen kann. Fumarat kann durch die Succinat-Dehydrogenase aus Succinat regeneriert werden.

Anschließend wird die Hydroxylgruppe des (2-Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA durch die 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA-Dehydrogenase BbsCD (eine Alkoholdehydrogenase)

oxidiert, wobei Benzoylsuccinyl-CoA entsteht. Die thiolytische Spaltung von Benzoylsuccinyl-CoA in der darauffolgenden Reaktion, katalysiert durch die Thiolase BbsAB, führt zu Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA (Leuthner & Heider, 2000). Benzoyl-CoA stellt ein gemeinsames Intermediat in den meisten anaeroben Abbauwegen aromatischer Kohlenwasserstoffe dar und wird anschließend durch einen stark konservierten Abbauweg, eingeleitet durch die Benzoyl-CoA-Reduktase, weiter bis hin zum Acetyl-CoA metabolisiert (Fuchs *et al.*, 2011, Boll *et al.*, 1997, Boll, 2005, Peters *et al.*, 2007). Succinyl-CoA wird durch die Succinat-Dehydrogenase zu Fumarat oxidiert und steht damit der Benzylsuccinat-Synthase als Kosubstrat wieder zur Verfügung (Abb. 9).

## IV. Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die weitere Aufklärung des Reaktionsmechanismus der BSS mittels biochemischer und spektroskopischer Analysen. Bereits in der Vergangenheit wurden durch EPR-Analysen organische Radikale als Reaktionsintermediate identifiziert, die aus verschiedenen Substratanaloga hervorgegangen sind. Durch weitere Experimente in diese Richtung sollten weitere Details im Reaktionsmechanismus aufgeklärt werden.

Dazu wurden mehrere Aminosäuren in der Nähe des katalytischen Zentrums der  $\alpha$ -Untereinheit der BSS mutiert, um das entsprechende Enzym in *A. aromaticum* EbN1-SR7 überzuproduzieren. Mit den erhaltenen Enzymaktivitäten der Extrakte sollten die Enzymaktivitäten und die Nutzung verschiedener Substrate jeweils im Vergleich zum Wildtypenzym analysiert werden.

Um auszuschließen, dass eine gemessene Aktivität auf das Wildtypenzym zurückzuführen ist und um die Rolle der unbekannten Gene *bssEFGH* aufzuklären, sollte das *bss*-Operon vollständig (*bssDCABEFGH*) und partiell (*bssEFGH*) deletiert werden.

Bei einer Reaktion von chiralem radioaktiv markiertem (*R*)- und (*S*)-Toluol mit je einem der drei verschiedenen Wasserstoffisotope an der Methylgruppe mit Fumarat kommt es an der Methylgruppe des Toluols entweder zu einer Inversion oder einer Retention der Konfiguration. In dieser Arbeit sollte die Stereospezifität der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase bezüglich der Methylgruppe aufgeklärt werden, um ein weiteres Indiz für die Richtigkeit des postulierten Reaktionsmechanismus zu erhalten.

## V. Material und Methoden

### 1. Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Alpha Aesar (Karlsruhe), AppliChem GmbH (Darmstadt), DIFCO Becton Dickinson (Detroit, USA), Merck (Darmstadt), Fluka (Buchs), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva Feinbiochemika (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Gase wurden von Praxair (Düsseldorf) bezogen. Enzyme stammten von den Firmen New England Biolabs (Frankfurt), Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) und Roche Diagnostics GmbH (Mannheim).

### 2. Mikrobiologische Methoden

#### 2.1 Verwendete Mikroorganismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tabelle 1:** Verwendete Mikroorganismen.

Stamm	Relevanter Genotyp	Referenz
<i>Thauera aromatica</i> K172	Wildtyp (DSM-Nr. 6984)	(Anders <i>et al.</i> , 1995)
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20</i> $\phi$ 80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>K</sub><sup>-</sup>m<sub>K</sub><sup>+</sup></i> ), λ <sup>-</sup>	(Woodcock <i>et al.</i> , 1989)
<i>Escherichia coli</i> TOP10	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 nupG recA1 araD139</i> Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galE15 galK16 rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1</i> λ <sup>-</sup>	(Invitrogen)
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) λ (DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i> ]) [ <i>malB<sup>+</sup></i> ] <sub>K-12</sub> (λ <sup>S</sup> )	(Studier & Moffatt, 1986)
<i>Escherichia coli</i> S17-1	<i>hsdR17, endA, pro, recA</i> , NxS, integriertesRP4-2 (Tc::Mu, Km,::Tn7), Mobilisatorstamm	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
<i>Escherichia coli</i> WM3064	<i>thrB1004 pro thi rpsL hsdS lacZ</i> ΔM15 RP4 1360Δ( <i>araBAD</i> )567 Δ <i>dapA1341::[erm pir]</i>	(Dehio & Meyer, 1997)

<i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1	Wildtyp	(Rabus <i>et al.</i> , 2005)
<i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1 SR7	Spontane Mutante isoliert nach Wachstum auf Streptomycin	(Wöhlbrand & Rabus, 2009)
<i>Aromatoleum aromaticum</i> DS01	SR7 mit pASG3bssStrep+ori1	Diese Arbeit
<i>Aromatoleum aromaticum</i> DS02	Deletionsmutante $\Delta bssDCABEFGH$	Diese Arbeit
<i>Aromatoleum aromaticum</i> DS03	Deletionsmutante $\Delta bssEFGH$	Diese Arbeit

## 2.2 Anaerobes Arbeiten

Die anaerobe Zellernte und Präparation von *Thauera aromatica* K172 und *Aromatoleum aromaticum* EbN1 Zellextrakt wurde in einem Anaerobenzelt (Coy Laboratory Products, MI, USA) durchgeführt. Die Atmosphäre im Zelt besteht aus 95 % N<sub>2</sub> und 5 % H<sub>2</sub>. Spuren von Sauerstoff wurden durch Palladiumkatalysatoren, an denen eine kontrollierte Knallgasreaktion abläuft, entfernt. Der Sauerstoff- und Wasserstoffgehalt im Anaerobenzelt wurde durch eine H<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Sensor (Coy Laboratory Products, MI, USA) gemessen.

Lösungen wurden durch die zyklische Vakuumisierung und das Zugeben von Stickstoff anaerobisiert. Anschließend wurden sie autoklaviert.

## 2.3 Anzucht von Mikroorganismen

Die Organismen *Escherichia coli*, *Thauera aromatica* K172 und *Aromatoleum aromaticum* EbN1 wurden in den jeweiligen, unten aufgeführten Medien kultiviert. Zur Quantifizierung des mikrobiologischen Wachstums wurde die Zelldichte durch Messung der Lichtabsorption bei 578 nm mithilfe des Photometers Cary 60 UV-Vis (Agilent, Santa Clara, CA, USA) bestimmt. Falls erforderlich wurde die Zellsuspension entsprechend verdünnt, um Messwerte im Bereich zwischen 0,1 und 0,3 zu erhalten.

## 2.4 Anzucht von *Escherichia coli*

*E. coli* wurde in LB-Medium (Lysogeny Broth; (Bertani, 1951), 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl) wenn nicht anders angegeben bei 37 °C durch Agitation aerob kultiviert.

Nach Induktion rekombinanter Gene wurden die Kulturen bei Raumtemperatur weiter inkubiert. Für die Herstellung fester Nährmedien wurde dem LB-Medium 1,5 % (w/v) Agar zugegeben.

Zur Kultivierung auf Selektivmedien wurden nach dem Autoklavieren Antibiotika zugegeben (Tab. 9).

### 2.5 Anzucht von *Thauera aromatica*

Die Kultivierung von *T. aromatica* wurde in anaeroben 2-l-Kulturflaschen in Mineralsalzmedium (Tab. 2 und 3) bei 28 °C unter Agitation durchgeführt. Das Medium wurde mit 2 mM Toluol als Kohlenstoffquelle und 4 mM Nitrat als Elektronenakzeptor nach dem Autoklavieren versetzt. Da Toluol in einer Konzentration von 1 – 2 mM für die Zellen toxisch wirkt, wurde das Medium mit 2 % (v/v) Paraffinöl überschichtet, in dem sich der größte Teil des Toluols löst und welches so als Reservoir fungiert. Der Verbrauch des Toluols wurde indirekt über den Verbrauch des Nitrats mithilfe von Quantofix-Nitratstäbchen (Macherey-Nagel, Düren) gemessen. Die Zellen wurden in der exponentiellen Phase bei einer OD<sub>578</sub> von 3 – 5 unter anaeroben Bedingungen geerntet.

**Tabelle 2:** Grundmedium zur Herstellung von *T. aromatica*-Medium. <sup>(1)</sup>: Zugabe bei Inkubation mit Toluol als Substrat.

Stammlösung	Zusammensetzung pro l Stlsg.	Konz. im Medium
Grundmedium, pH8	0,6 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	7,9 mM
	5,6 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	32,1 mM
	0,54 g NH <sub>4</sub> Cl	10 mM
	ggf. 20 ml/l Paraffinöl <sup>(1)</sup>	2 % (v/v)

**Tabelle 3:** Supplemente, die nach dem Autoklavieren des Grundmediums zum selbigen hinzugegeben werden; <sup>(2)</sup>: pH einstellen auf 6,5 mit NaOH, <sup>(3)</sup>: sterilfiltrieren mit 0,2 µm Sterilfilter und Zugabe nach dem Autoklavieren des Grundmediums; <sup>(4)</sup>: Zugabe nach dem Autoklavieren des Grundmediums.

Supplement	Zusammensetzung pro l Stlsg.	Zugabe zum GM	Konz. im Medium
0,8 M MgSO <sub>4</sub> - Stlsg.	197,18 g MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1 ml/l	0,8 mM
0,1 M CaCl <sub>2</sub> - Stlsg.	14,7 g CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1 ml/l	0,1 mM
2 M NaNO <sub>3</sub> – Stlsg.	169,98 g NaNO <sub>3</sub>	2 ml/l	2 mM

Spurenelementlösung SL7 (1000 x) <sup>(2, 4)</sup>	3 g Fe (II) Cl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O 70 mg ZnCl <sub>2</sub> 100 mg MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O 4 mg CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O 24 mg NiCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O 36 mg Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O 6 mg H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1 ml/l	1,5 µM 0,5 µM 0,5 µM 0,02 µM 0,1 µM 0,15 µM 0,01 µM
Vitaminsammlösung VL7 (1000 x) <sup>(3, 4)</sup>	80 mg 4-Aminobenzoat (H <sub>1</sub> ) 100 mg Ca (+)-Pantothenat 100 mg Cyanocobalamin (B <sub>12</sub> ) 20 mg D (+)-Biotin 200 mg Nicotinat 300 mg Pyridoxin-HCl (B <sub>6</sub> ) 200 mg Thiamin-HCl (B <sub>1</sub> )	1 ml/l	0,8 mg/l 0,1 mg/l 0,1 mg/l 0,02 mg/l 0,2 mg/l 0,3 mg/l 0,2 mg/l
Natriumselenit/Natriumwolframat- Stammlösung <sup>(4)</sup>	2 mg Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> · 5 H <sub>2</sub> O 4 mg Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O 0,5 mg NaOH	1 ml/l	11,6 nM 12,1 nM 12,5 nM

### 2.6 Anzucht von *Aromatoleum aromaticum* EbN1 und Derivate

EbN1 wurde auf zwei verschiedenen Minimalmedien (Tab. 4 und 5) anaerob bei 28 °C unter Agitation kultiviert. Die Medium wurde mit 4 mM Benzoat oder 2 mM Toluol als Kohlenstoffquelle und 4 mM Nitrat als Elektronenakzeptor nach dem Autoklavieren versetzt. Wie bei *T. aromatica* wurde aufgrund der Toxizität des Toluols in einer Konzentration von 1 – 2 mM das Medium mit 2 % (v/v) Paraffinöl überschichtet und der Verbrauch des Toluols mithilfe von Quantofix-Nitratstäbchen (Macherey-Nagel, Düren) gemessen.

Das Minimalmedium (MM, Tab. 4) wird durch Calciumcarbonat gepuffert und stellt das Standardmedium für Wachstums- und Kultivierungsmethoden dar.

Für die Anzucht im Festmedium und für Konjugationszwecke wurde ein Kaliumphosphat-gepuffertes Normalmedium (NM, Tab. 5) verwendet.



**Tabelle 4:** Zusammensetzung von Minimalmedium zur Anzucht von *A. aromaticum* EbN1 und EbN1-SR7. Zur Pufferung des Mediums wurden 40 ml/l 1 M NaHCO<sub>3</sub>-Lösung zugegeben, um eine Konzentration im Medium von 40 mM zu erreichen. Der pH-Wert wurde anschließend mit anaerober 6 M HCl-Lösung auf ca. 6,5 eingestellt. <sup>(1)</sup>: Zugabe zum Medium bei Anzucht mit Toluol als Kohlenstoffquelle.

Stammlösung	Zusammensetzung pro l Stlsg.	Konz. im Medium
Grundmedium	0,5 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,6 mM
	0,3 g NH <sub>4</sub> Cl	5,6 mM
	0,5 g MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	2,5 mM
	0,1 g CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,6 mM
	0,3 g NaNO <sub>3</sub>	3,53 mM
	ggf. 20 ml/l Paraffinöl <sup>(1)</sup>	2 % (v/v)

**Tabelle 5:** Zusammensetzung von Normalmedium/Nitratreduzierermedium (NM) zur Anzucht von *A. aromaticum* EbN1 und EbN1-SR7. <sup>(1)</sup>: Zugabe bei Inkubation auf Festmedium; <sup>(2)</sup>: Zugabe bei Herstellung von ‚Mating‘-Festmedium; <sup>(3)</sup>: Zugabe bei Inkubation mit Toluol als Substrat.

Stammlösung	Zusammensetzung pro l Stlsg.	Konz. im Medium
Grundmedium	0,23 g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,6 mM
	1 g NaCl	17 mM
	2,55 g NaNO <sub>3</sub>	30 mM
	1,6 g NH <sub>4</sub> Cl	29,9 mM
	ggf. 20 g Agar (AppliChem) <sup>(1, 2)</sup>	2 % (w/v)
	ggf. 10 g Trypton <sup>(2)</sup>	10 g/l
	ggf. 20 ml/l Paraffinöl <sup>(3)</sup>	2 % (v/v)

**Tabelle 6:** Supplemente des NM. <sup>(1)</sup>: Zugabe nach dem Autoklavieren des Grundmediums; <sup>(2)</sup>: Die Zugabe erfolgt bei der Herstellung von ‚Mating‘-Festmedium.

Supplement	Zusammensetzung pro l Stlsg.	Zugabe zum GM	Konz. im Medium
1 M MgCl <sub>2</sub> -Stlsg. (1000 x) <sup>(1)</sup>	95,21 g MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1 ml/l	1 mM
0,6 M CaCl <sub>2</sub> -Stlsg. (1000 x) <sup>(1)</sup>	88 g CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	1 ml/l	0,6 mM
1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Stlsg. <sup>(1)</sup>	136,09 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 ml/l	4 mM
1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Stlsg. <sup>(1)</sup>	174,18 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	16 ml/l	16 mM
1 M Pyruvat-Stlsg. <sup>(1, 2)</sup>	110,05 g Natriumpyruvat	5 ml/l	5 mM
1 M Acetat-Stlsg. <sup>(1, 2)</sup>	82,03 g Natriumacetat	5 ml/l	5 mM

**Tabelle 7:** Supplemente für NM und MM. <sup>(1)</sup>: Nach dem Lösen der Substanzen wird der pH mit NaOH auf 6,5 eingestellt, die Lösung anaerobisiert und autoklaviert. <sup>(2)</sup>: Nach dem Lösen der Substanzen wird die Lösung mit einem 0,2 µm Sterilfilter sterilfiltriert und anaerobisiert. <sup>(3)</sup>: Nach dem Lösen der Substanzen wird die Lösung anaerobisiert und autoklaviert. <sup>(4)</sup>: Die Zugabe erfolgt nach dem Autoklavieren des Grundmediums.

Supplement	Zusammensetzung pro L Stlsg.	Zugabe zum GM	Konz. im Medium
Spurenelement-Stlsg. SL10 (1000 x) <sup>(1, 4,)</sup>	5,2 g Na <sub>2</sub> EDTA 2,1 g FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O 30 mg H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 100 mg MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O 24 mg CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O 24 mg NiCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O 29 mg CuCl · H <sub>2</sub> O 144 mg ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O 36 mg Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	1 ml/l	5,2 mg/l 2,1 mg/l 30 µg/l 100 µg/l 24 µg/l 24 µg/l 29 µg/l 144 µg/l 36 µg/l
Vitamin-Stlsg. VL7 (1000 x) <sup>(2, 4)</sup>	80 mg 4-Aminobenzoessäure 100 mg Ca-D-(+)-Pantothenat 100 mg Cyanocobalamin (B <sub>12</sub> ) 20 mg D (+) -Biotin 200 mg Nikotinsäure 300 mg Pyridoxamin-HCl (B <sub>6</sub> ) 200 mg Thiamindichlorid (B <sub>1</sub> )	1 ml/l	0,08 mg/l 0,1 mg/l 0,1 mg/l 0,02 mg/l 0,2 mg/l 0,3 mg/l 0,2 mg/l
Selen-Wolframat-Stlsg. (1000 x) <sup>(3, 4)</sup>	6 mg Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> · 5 H <sub>2</sub> O 6 mg Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O 0,4 g NaOH	1 ml/l	6 µg/l 6 µg/l 400 µg/l

**Tabelle 8:** Verwendete Kohlenstoffquellen. Die Zugabe von Toluol erfordert die Verwendung von Paraffinöl (s. Tab. 4 und 5). Die Zugabe erfolgt in beiden Fällen nach dem Autoklavieren des Grundmediums und nach vollständigem Verbrauch des Nitrats.

Kohlenstoffquelle	Zusammensetzung pro L	Zugabe zum GM	Konz. im Medium
Toluol	100 % Toluol (9,1 M)	100 µl/l	0,91 mM
1 M Natriumbenzoat	144,11 g/l	2 ml/l	2 mM

## 2.7 Antibiotika

Den Medien wurde das jeweils benötigte Antibiotikum vor dem Inokulieren aus einer Stocklösung zugesetzt. Zur Herstellung der Stocklösungen wurde das jeweilige Antibiotikum in Wasser gelöst und anschließend sterilfiltriert. Eine Ausnahme stellt Chloramphenicol dar,

welches in 70 % [v/v] Ethanol gelöst wurde. Die Lagerung der Stocklösungen erfolgte bis zur Verwendung bei -20 °C.

**Tabelle 9:** Verwendete Antibiotika. Mit Ausnahme von Chloramphenicol erfolgte die Herstellung der Stammlösungen mit H<sub>2</sub>O. Alle Stammlösungen wurden sterilfiltriert und bis zur Verwendung in 1 ml-Portionen bei -20 °C gelagert. Die Zugabe zum Medium erfolgte, wenn dieses ausreichend abgekühlt war.

Antibiotikum	Verwendete Stammlösung	Konzentration im Medium
Ampicillin	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O	100 µg/ml
Chloramphenicol	30 mg/ml in 70 % Ethanol	30 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O	50 µg/ml
Streptomycin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O	50 µg/ml

## 2.8 Transformation von Mikroorganismen

### 2.8.1 Herstellung elektrokompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen wurde mithilfe einer Einzelkolonie eine Übernachtskultur inokuliert und ca. 16 Stunden über Nacht inkubiert. Anschließend wurden 100 ml dYT-Medium (16 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) mit der Übernachtskultur auf eine OD<sub>578</sub> von 0,1 beimpft und diese Hauptkultur bei Raumtemperatur bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,4 unter Agitation inkubiert. Die Zellkultur wurde im Eisbad unter Schütteln rasch abgekühlt, auf 50-ml-Schraubdeckel-Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht) verteilt und weitere 30 Minuten im Eisbad inkubiert. Die Kultur wurde 10 Minuten bei 4 °C und 3000 rpm (Universal 320R, Hettich, Tuttlingen) zentrifugiert und das Zellsediment in 50 ml eiskaltem Wasser resuspendiert. Nach Wiederholung der Zentrifugation wurden die sedimentierten Zellen in 5 ml eiskaltem Wasser aufgenommen und dabei der Inhalt mehrerer Reaktionsgefäße vereinigt. Nach zweimaliger Wiederholung der Zentrifugation, unterbrochen durch einen weiteren Waschschrift, wurde das Zellsediment in 1 ml eiskaltem 10 % Glycerin (w/v) resuspendiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde in 50-µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 2.8.2 Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach Inoue *et al.* (1990). Ausgehend von einer Einzelkolonie des betreffenden *E. coli*-Stammes wurde eine 5-ml-

Übernachtskultur inokuliert. Mit dieser Kultur wurden 250-ml-SOB-Medium (2,0 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM MgSO<sub>4</sub>) angeimpft und bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,4 bis 0,6 bei Raumtemperatur unter Agitation kultiviert. Anschließend wurde die Zellsuspension zunächst für zehn Minuten auf Eis rasch abgekühlt und dann zehn Minuten bei 4 °C und 1500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 80 ml kaltem Transformationspuffer (TB: 10 mM PIPES; 15 mM CaCl<sub>2</sub>; 250 mM KCl, pH 6,7, eingestellt mit KOH, nach dem Autoklavieren Zugabe von 55 mM MnCl<sub>2</sub>,) resuspendiert. Es folgte eine Inkubation auf Eis für zehn Minuten und anschließende Zentrifugation bei 1500 x g und 4 °C für zehn Minuten. Nach Aufnahme der Zellen in 20 ml Transformationspuffer wurden 7 % (v/v) steriles DMSO hinzugefügt und die Suspension erneut 10 Minuten auf Eis inkubiert. Aliquots zu je 200 µl wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 2.8.3 Transformation elektrokompenter *Escherichia coli*-Zellen

Die Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen erfolgte durch Elektroporation bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF (Dower *et al.*, 1988) mit Plasmid-DNA oder Ligationsansätzen, die mit 1-Butanol gefällt worden waren.

Ein 50-µl-Aliquot elektrokompenter *E. coli*-Zellen wurde auf Eis aufgetaut und anschließend mit 1 µl Plasmid-DNA (10-40 ng) oder 8 µl des zuvor gefällten und in H<sub>2</sub>O resuspendierten Ligationsansatzes versetzt. Der Ansatz wurde in eine 0,2 µm-Elektroporationsküvette (peqlab, Erlangen) überführt und in einem Elektroporator (MicroPulser, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) einem elektrischen Impuls mit den oben genannten Parametern ausgesetzt. Die Zellen wurden mithilfe von 500 µl sterilem LB-Medium aus der Elektroporationsküvette herausgespült und für 30 (Ampicillin) bzw. 60 Minuten (Chloramphenicol, Kanamycin) unter Agitation (800 – 1000 rpm, Thermomixer 5436; Eppendorf, Hamburg) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz in 100- und 400-µl-Portionen auf zwei LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

### 2.8.4 Transformation chemisch kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Ein bei -80 °C gelagertes 100-µl-Aliquot chemisch kompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut und mit 1 µl Plasmid-DNA (10-40 ng) versetzt. Der Ansatz wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (42 °C, 30 - 45 Sekunden) wurden die Zellen nochmals für

fünf Minuten auf Eis inkubiert und nach Zugabe von 200 µl LB-Medium für 30-60 Minuten bei 37 °C unter Agitation inkubiert (800 - 1000 rpm; Thermomixer 5436; Eppendorf, Hamburg). Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

#### 2.8.5 Konjugation von *Aromatoleum aromaticum* EbN1-SR7

Die in *A. aromaticum* zu transferierenden Plasmide wurden über chemische Transformation (Abschnitt 2.8.4) in die *E. coli*-Stämme S17-1 (Simon *et al.*, 1983) oder WM3064 (Dehio & Meyer, 1997) transferiert. Für die anschließende Konjugation wurden die erhaltenen *E. coli*-Stämme ‚S17-1+Plasmid‘ oder ‚WM3064+Plasmid‘ in 5 ml LB-Medium kultiviert. Als *A. aromaticum* – Akzeptorstamm wurde der Stamm SR7 mit einer Streptomycinresistenz verwendet (Wöhlbrand & Rabus, 2009), der zur Konjugation 2 Tage in NM-Medium mit Benzoat kultiviert wurde. Um zwischen den Organismen *E. coli* S17-1 bzw. WM3064 und *A. aromaticum* EbN1-SR7 ein Konjugationsereignis zu erreichen, wurden sie in verschiedenen Verhältnissen gemischt und 5 Minuten bei 15 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment 2 Mal mit jeweils 500 µl supplementiertem NM-Medium (Abschnitt 2.6) gewaschen und bei 15 000 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Das Sediment nach dem zweiten Waschschrift wurde mit 20 µl NM-Medium resuspendiert und die erhaltene Zellsuspension als Klecks auf eine NM-, ‚Mating‘-Agarplatte (Abschnitt 2.6) gegeben. Die Agarplatte wurde mit dem Deckel nach oben für ca. 16 Stunden bei 28 °C inkubiert und der Zellklecks anschließend mit einer Impföse von der Platte gekratzt. Die an der Impföse haftenden Zellen wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben, in das zuvor 500 µl NM-Medium vorgelegt wurden. Nach der Resuspension der Zellen erfolgte eine dreistündige Inkubation bei 28 °C mit leichter Agitation (400 rpm, Thermomixer 5436; Eppendorf, Hamburg). Von dieser Zellsuspension wurden verschiedene Verdünnungsstufen auf NM-Agar ausplattiert und 8 – 12 Tage bei 28 °C anaerob inkubiert. Im Falle von *E. coli* WM3064 erfolgte die Trennung der verschiedenen Bakterienarten einmal durch Zugabe von Streptomycin (*A. aromaticum* EbN1-SR7 hat eine chromosomal bedingte Resistenz (Wöhlbrand & Rabus, 2009)) und durch das Weglassen von 2,6-Diaminopimelinsäure (DAP). *E. coli* WM3064 ist DAP-auxotroph (Dehio & Meyer, 1997).

### 3. Molekularbiologische Methoden

#### 3.1 Plasmide und Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 10, die verwendeten Oligonukleotide in Tabelle 11 dargestellt.

**Tabelle 10:** Verwendete Plasmide.

Plasmid	Relevanter Genotyp/Beschreibung	Referenz
pASG3_mob <sup>+</sup> _BSS-Strep+BssD-Txn (mit <i>E. coli</i> ori)→in dieser Arbeit pASG3bssStrep+ori1	Amp <sup>R</sup> ( <i>bla</i> ), Plasmid zur heterologen Überproduktion von BSS in <i>A. aromaticum</i>	(Hilberg, 2012)
pJoe2775_BSS-geo	Amp <sup>R</sup> ( <i>bla</i> ), Plasmid zur Amplifikation von <i>bssAB</i> aus <i>Geobacter metallireducens</i>	(Hilberg, 2012)
pBSS-Strep-T.aro-G.met.	Amp <sup>R</sup> ( <i>bla</i> ), pBSS-Strep mit <i>bssAB</i> aus <i>Geobacter metallireducens</i>	Diese Arbeit
pASGStrep-T.aro-G.met	Amp <sup>R</sup> ( <i>bla</i> ), pASG3bssStrep+ori1 mit <i>bssAB</i> aus <i>Geobacter metallireducens</i>	Diese Arbeit
pASG3bssStrepCys489SecUGA	Amp <sup>R</sup> ( <i>bla</i> ), pASG3bssStrep+ori1-Derivat	Diese Arbeit
pASG3bssStrepCys489SecUAG	Amp <sup>R</sup> ( <i>bla</i> ), pASG3bssStrep+ori1-Derivat	Diese Arbeit
pASK6C	Cm <sup>R</sup> ( <i>cat</i> )	Diese Arbeit
pK19mobsacB	Kan <sup>R</sup> ( <i>nptII</i> ), pMB1 ori, <i>sacB</i> , <i>lacZα</i> , <i>mob</i> (oriTRP4),	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
pK19mobsacBOpdel	Kan <sup>R</sup> ( <i>nptII</i> ), pMB1 ori, <i>sacB</i> , <i>lacZα</i> , <i>mob</i> (oriTRP4), Cm <sup>R</sup> ( <i>cat</i> ), pK19mobsacB-Derivat	Diese Arbeit
pK19mobsacBDBdel	Kan <sup>R</sup> ( <i>nptII</i> ), pMB1 ori, <i>sacB</i> , <i>lacZα</i> , <i>mob</i> (oriTRP4), Cm <sup>R</sup> ( <i>cat</i> ), pK19mobsacB-Derivat	Diese Arbeit
pK19mobsacBEHdel	Kan <sup>R</sup> ( <i>nptII</i> ), pMB1 ori, <i>sacB</i> , <i>lacZα</i> , <i>mob</i> (oriTRP4), Cm <sup>R</sup> ( <i>cat</i> ), pK19mobsacB-Derivat	Diese Arbeit
pASG3bssStrepIle617+620Val	Amp <sup>R</sup> ( <i>bla</i> ), pASG3bssStrep+ori1-Derivat	Diese Arbeit
pASG3bssStrepIle620Val	Amp <sup>R</sup> ( <i>bla</i> ), pASG3bssStrep+ori1-Derivat	Diese Arbeit
pASG3bssStrepIle620Gln	Amp <sup>R</sup> ( <i>bla</i> ), pASG3bssStrep+ori1-Derivat	Diese Arbeit
pASG3bssStrepArg508Lyss	Amp <sup>R</sup> ( <i>bla</i> ), pASG3bssStrep+ori1-Derivat	Diese Arbeit
pASG3bssStrepArg508Gln	Amp <sup>R</sup> ( <i>bla</i> ), pASG3bssStrep+ori1-Derivat	Diese Arbeit

**Tabelle 11:** Verwendete Oligonukleotide.

Nr.	Name	Sequenz (5' → 3')
P1	obssOp-up-for-BamHI	GCAGCAGGATCCGTTCTCGTTGGCGACTTCCTCGG
P2	obssOp-up-rev-Cat-rev	CCACTACGTGAACCATCACCTAATCCGCAACGGGAACGATATTCCGCG
P3	obssE-H-up-for-BamHI	GCAGCAGGATCCGTGCAGTTCAACGTGGTCAGC
P4	obssE-H-up-rev-Cat-rev	CCACTACGTGAACCATCACCTAATCCGTTACACGTGGTCGCGGAAGCTC
P5	obssD-B-down-for-Cat-for	GAGTGGCAGGGCGGGGCGTAATAGCAACAGGGCCAGACATCATGAAGACC
P6	obssD-B-down-rev-XbaI	GCAGCATCTAGACCGACGACGTTGATGATCTCGCTCGC
P7	obssOp-down-for-Cat-for	GAGTGGCAGGGCGGGGCGTAATAGCTGCTCGCGATCGCGTGTTCC
P8	obssOp-down-rev-XbaI	GCAGCATCTAGACTTGATGACGTACAGCCGGCCTTC
P9	oCatOp-for	CGCGGAATATCGTTCCCGTTGCGGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGG
P10	oCatE-H-for	GAGCTTCCGCGACCACGTGTAACGGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGG
P11	oCatOp-rev	GAACAGCGCGATCGCGAGCAGCTATTACGCCCCGCCCTGCCACTC
P12	oCatD-B-rev	GGTCTTCATGATGTCTGGCCCTGTTGCTATTACGCCCCGCCCTGCCACTC
P13	obssOpup-for-HindIII	GACGACAAGCTTGTTCTCGTTGGCGACTTCCTCG
P14	obssOpup-rev-Cat-rev (2)	CGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGGTAGCCGACTGTACGGAGACTGACTG
P15	obssOpdown-for-Cat-for (2)	CGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAATAGGCTCGTCACGCTCGCGCATGGCATCAACAGC
P16	obssDB-down-for-Cat-for (2)	CGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAATAGGCCAGACATCATGAAGACCAGCGGACTCCTC
P17	oCatOp-for (2)	CAGTCAGTCTCCGTACAGTCGGCTACCTGGAACAACACTCAACCCTATCTC G
P18	oCatOp-rev (2)	GCTGTTGATGCCATGCGCGAGCGTGACGAGCCTATTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCG
P19	oCatD-B-rev (2)	GAGGAGTCCGCTGGTCTTCATGATGTCTGGCCTATTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCG
P20	obssOpuprev (3)	GTTGAGTGTTGTTCCAGCGAGCACTATCGTACTG
P21	obssOpdownfor (3)	CAGGGCGGGGCGTAATAGGCACTTTCTCGTCACGC
P22	obssOpdownrevXbaI (2)	GCAGCATCTAGACTTCGAGACGGTAGTCG
P23	obssCatOpfor (3)	CAGTACGATAGTGCTCGCTGGAACAACACTCAAC
P24	obssCatOprev (3)	GCGTGACGAGAAAAGTGCCTATTACGCCCCGCCCTG
P25	obssE-H-up-for-HindIII	GACGACAAGCTTCGTGCAGTTCAACGTGGTCAGC
P26	obssE-H-up-rev-Cat-rev (2)	CGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGCGTTACACGTGGTCGCGGAAGCTCAGTTCCG
P27	oCatE-H-for (2)	CGAACTGAGCTTCCGCGACCACGTGTAACGCTGGAACAACACTCAACCCTATCTCG
P28	obssOpupconfor1	CAGCTCTCCGGTTGAATTCTG

<b>P29</b>	obssOpupconrev2	GTGCCAACGGCATGGTCTTC
<b>P30</b>	obssOpdoconfor3	GCAGCTCCAGGCATCCTTC
<b>P31</b>	obssOpdoconrev4	GCCGTAGCGCTCGAAGTAAC
<b>P32</b>	obssOpupconrevPL5	GACTGGCTTTCTACGTGTTCC
<b>P33</b>	obssOpdownconforPL6	GTGTGGAATTGTGAGCGGATAAC
<b>P34</b>	opASGbssStrep_Geo_for	CGCATGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAATCAACGGTTGCTGCATCAATAAG
<b>P35</b>	opASGbssStrep_Geo_rev	GCTGGATCCAGTATCACACATGTTCTCTGAAGC
<b>P36</b>	obssStrep_C489U-UGA-NheI-for	CAACGTGCTGTGAATGGCGCCGGGGCTAGCCGGCCG
<b>P37</b>	obssStrep_C489U-UGA-NheI-rev	CGGCCGGCTAGCCCCGGCGCCATTCACAGCACGTTG
<b>P38</b>	obssStrep_C489-UAG-XbaI-for	CAACGTGCTCTAGATGGCGCCGG
<b>P39</b>	obssStrep_C489-UAG-XbaI-rev	CCGGCGCCATCTAGAGCACGTTG
<b>P40</b>	opASG3bssstrepOri1-for	GTACTACAAGGCGAGCGTGATC
<b>P41</b>	opASG3bssstrepOri1-rev	GAGCAGATTGGCCTTCTGGTTC
<b>P42</b>	opASGbssstrep-IleP1-WT-rev	GGTGATCGGGTTATGCCAGCCATTGGGCTGTTC
<b>P43</b>	opASGbssstrep-IleP2-I-V-MluI-rev	GGTCACCGGGTTATGCCAGCCATTGGGCTGTTCCGACAACGCGTTC
<b>P44</b>	opASGbssstrep-IleP3-I-V-EcoRI-for	TCCGTCGTCGCAGGGAATTCGCTCGTC
<b>P45</b>	opASGbssstrep-IleP4-I-Q-EcoRI-for	TCCAAGTCGCAGGGAATTCGCTCGTCGATC
<b>P46</b>	opASGbssstrep-ArgP1-R-K-BamHI-for	CAGAAGACCAAGTCCGAGGGCGGATCCGCGATC
<b>P47</b>	opASGbssstrep-ArgP2-R-K-BamHI-rev	GATCGCGGATCCGCCCTCGGACTTGGTCTTCTG
<b>P48</b>	opASGbssstrep-ArgP3-R-Q-BamHI-for	CAGAAGACCCAGTCCGAGGGCGGATCCGCGATC
<b>P49</b>	opASGbssstrep-Arg-P4-R-Q-BamHI-rev	GATCGCGGATCCGCCCTCGGACTGGGTCTTCTG
<b>P50</b>	odelDB-check-rev	GTTGAAGGCATCGACGGAATC
<b>P51</b>	odelEH-check-for	CTCAACCAGCGTCTGTCTGTC



### 3.2 Isolierung von chromosomaler DNA aus *Aromatoleum aromaticum* EbN1

Chromosomale DNA von *A. aromaticum* EbN1 wurde nach der Hexadezyltrimethylammoniumbromid (CTAB)-Methode (Murray & Thompson, 1980) aus 100 ml-Kulturen isoliert, die zwei Tage lang bei 28 °C mit Benzoat als Wachstumssubstrat inkubiert und nach 24 Stunden erneut mit 4 mM Nitrat und 4 mM Benzoat gefüttert worden waren. Die *A. aromaticum*-Kultur wurde 20 Minuten bei 1500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 1,7 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM Na-EDTA, pH 8) resuspendiert. Nach Zugabe von 90 µl 10 % Natriumdodecylsulfat (SDS) und 9 µl Proteinase K (20 mg/ml) erfolgte eine Inkubation für eine Stunde bei 52 °C. Anschließend wurden 300 µl 5 M NaCl und 240 µl CTAB/NaCl-Lösung (2 % (w/v) CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid); 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM EDTA, pH 8,0; 1,4 M NaCl, vor Verwendung auf 65 °C erwärmt) zugegeben und der Ansatz gemischt. Nach einer weiteren zehnmündigen Inkubation bei 65 °C und der Zugabe von 1 Volumen (ca. 2,3 ml) Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Roti®, 25:24:1, in TE-Puffer, pH 7,5 – 8, gebrauchsfertig, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) wurde der Ansatz bei 1500 x g für ca. 45 Minuten zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Volumen (ca. 2,1 ml) Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt. Dieser Ansatz wurde weitere 30 Minuten bei 1500 x g zentrifugiert, die obere Phase abgenommen und auf drei 1,5-ml-Reaktionsgefäße zu jeweils 700 µl verteilt. In jedes dieser Gefäße wurde ¼ Volumen (525 µl) Isopropanol zur Präzipitation der DNA zugegeben, durch Invertieren gemischt und anschließend bei 15800 x g für zehn Minuten zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70 % eiskaltem Ethanol gewaschen, anschließend für drei Minuten im ‚SpeedVac Concentrator‘ (Savant) getrocknet und schließlich in 40 µl destilliertem H<sub>2</sub>O für eine Stunde bei 50 °C oder über Nacht bei Raumtemperatur gelöst. Zur Entfernung der RNA wurden 2 µl RNase A (20 mg/ml) zugegeben und der Ansatz bei 37 °C für 20 Minuten inkubiert. Die DNA wurde anschließend auf einem 1 % -igen Agarose-Gel auf Sauberkeit und Konzentration überprüft.

### 3.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde nach einer abgewandelten Methode nach Birnboim & Doly (1979) isoliert. Die hierbei verwendeten Lösungen sind in Tabelle 12 aufgeführt. Zellen einer 5 ml Übernacht-Kultur wurden bei 15800 x g für zwei Minuten zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellsediment in 200 µl P1-Lösung und 5 µl RNase A (10 mg/ml) resuspendiert

(Tabelle 12). Nach Zugabe von 300 µl P2-Lösung, 300 µl eiskalter P3-Lösung und jeweils anschließend Invertieren zum Mischen des Ansatzes erfolgte eine zehnminütige Inkubation auf Eis und ein ebenfalls zehnminütiger Zentrifugationsschritt bei 15800 x g. Der Überstand wurde abgenommen, zur Präzipitation der DNA mit 750 µl Isopropanol versetzt und bei 15800 x g für zehn Minuten zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit 500 µl eiskaltem 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und schließlich in 50 - 100 µl destilliertem H<sub>2</sub>O gelöst.

Zur Plasmidpräparation höherer Reinheit wurde das GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) nach Herstellerangaben verwendet.

**Tabelle 12:** Für die Präparation von Plasmid-DNA verwendete Lösungen.

Lösungen	Zusammensetzung
P1	50 mM Tris/HCl; EDTA, pH 8
P2	0,2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS
P3	3 M Kaliumacetat, pH 5,5; gelagert bei 4 °C
RNase A	10 mg/ml in 5 mM Tris/HCl, pH 8; 10 Min. auf 100 °C erhitzt und auf Eis abkühlen lassen

### 3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente wurden mittels Polymerasekettenreaktion (Mullis *et al.*, 1986) in einem Thermocycler amplifiziert. Für die vollständige oder partielle Deletion des *bss*-Operons und für Sequenzierungen wurden die nötigen Fragmente in Reaktionen im präparativen Maßstab ( $\geq 100$  µl) amplifiziert. Zur Verifizierung von Insertions- und Deletionsmutanten wurden Reaktionen im analytischen Maßstab (20 µl) angesetzt. In beiden Anwendungen wurde käufliche (Thermo Fisher Scientific) oder im Labor gereinigte Phusion-DNA-Polymerase mit einer Verdünnung von 1:4 verwendet.

Zur Erzeugung von Punktmutationen auf dem Plasmid pASG3bssStrep+ori1 wurde die KOD-Polymerase (Merck, Darmstadt) verwendet, die für längere Amplifikate geeignet ist.

Als Matrize wurde gereinigte chromosomale DNA oder unmittelbar vor der Analyse hergestellter Rohextrakt verwendet. Dafür wurde 1 ml einer *A. aromaticum*-Kultur bei 15800 x g für drei Minuten zentrifugiert, das Sediment in 100 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und zehn Minuten bei 98 °C inkubiert. Diese Suspension wurde kurz auf Eis abgekühlt, erneut bei 15800 x g für zehn Minuten zentrifugiert und vom Überstand 2 µl in die PCR-Reaktion

eingesetzt. Jeder Reaktionsansatz enthielt neben der DNA-Polymerase, einem geeigneten Puffer und der entsprechenden Matrize 200 µM Desoxyribonukleotide (dNTPs) und je 0,2 µM eines Oligonukleotidpaares (Tabelle 11). Die Oligonukleotide für diese Arbeit wurden von biomers (Ulm) in getrockneter Form nach Kartuschenreinigung bezogen. Vor der Verwendung wurden die Oligonukleotide durch Resuspendieren mit H<sub>2</sub>O dest. auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt. Von diesen Stammlösungen wurden Arbeitsverdünnungen mit einer Konzentration von 10 µM hergestellt.

Das Standardprogramm der Polymerasekettenreaktion ist in Tabelle 13 aufgeführt. Die Schritte 3, 4 und 5 werden dabei 30 - 40 Mal durchlaufen. Zur Reinigung der amplifizierten Fragmente wurde das ‚PCR Purification Kit‘ von Thermo Scientific nach Herstellerangaben verwendet.

**Tabelle 13:** Standardprogramme für die Polymerasekettenreaktion mit den in dieser Arbeit verwendeten Polymerasen.

Reaktionsschritt		Phusion-Polymerase		KOD-Hot Start-Polymerase	
		Temperatur (°C)	Zeit (s)	Temperatur (°C)	Zeit (s)
1	Aktivierung der Pol.	-	-	94	120
2	Denaturierung	98	30	94	30
3	Denaturierung	98	10	94	15
4	<i>annealing</i>	50 - 65	30	50 – 65	30
5	Elongation	72	15 – 30/kBp	72	20 – 40/kBp
6	Elongation	72	300	72	300
7	Kühlphase	4 - 10	variabel	4 - 10	variabel

**Tabelle 14:** In dieser Arbeit angesetzte PCR-Reaktionen.

Komponente	Phusion-Polymerase		KOD-Hot Start-Polymerase 50 µl-Reaktion
	100 µl-Reaktion	20 µl-Reaktion	
<b>Puffer</b>	20 µl 5 x GC Puffer	4 µl 5 x GC-Puffer	5 µl 10 x PCR-Puffer KOD HS
<b>10 mM dNTPs</b>	2 µl ( $\triangleq$ 200 µM)	0,4 µl ( $\triangleq$ 200 µM)	2 µl ( $\triangleq$ 200 µM)
<b>Primer A (10 µM)</b>	2 µl ( $\triangleq$ 0,5 µM)	0,4 µl ( $\triangleq$ 0,5 µM)	1,5 µl ( $\triangleq$ 0,3 µM)
<b>Primer B (10 µM)</b>	2 µl ( $\triangleq$ 0,5 µM)	0,4 µl ( $\triangleq$ 0,5 µM)	1,5 µl ( $\triangleq$ 0,3 µM)
<b>Matrize</b>	50 – 100 ng gen. DNA	500 – 100 ng gen. DNA	1 ng Plasmid-DNA
<b>DMSO</b>	3 µl ( $\triangleq$ 3 %)	0,6 µl ( $\triangleq$ 3 %)	1,5 ( $\triangleq$ 3 %)
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	-	-	3 µl ( $\triangleq$ 1 mM)
<b>DNA-Polymerase</b>	1 – 2 µl (1 – 2 U)	0,4 – 0,8 µl (0,4 – 0,8 U)	2 µl KOD HS Pol. (1 U/µl $\rightarrow$ 2 U)
<b>H<sub>2</sub>O dest.</b>	ad 100 µl	ad 20 µl	ad 50 µl

### 3.5 Elektrophorese von DNA

DNA-Fragmente wurden im 1 %-igen (w/v) Agarosegel elektrophoretisch bei 60 - 120 V aufgetrennt, wobei TAE (40 mM Tris, 11,42 % Essigsäure, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,5) als Laufpuffer diente. Die Agarose wurde durch Aufkochen in TAE gelöst. Als Größenstandard diente der ‚GeneRuler DNA Ladder Mix‘ von Thermo Scientific mit Fragmenten von 100 – 10000 Basenpaaren. Durch Auftragung des dekadischen Logarithmus der DNA-Fragment-Größen des Größenstandards gegen die zugehörige Laufstrecke wurden die Größen erhaltener Fragmente bestimmt. Nach der Auftrennung wurde das Gel 10 Minuten in einer wässrigen Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) inkubiert und die DNA anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht. Zur Isolierung einzelner Fragmente aus dem Agarosegel wurde das ‚PCR Gel Extraction Kit‘ von Thermo Fisher Scientific nach Herstellerangaben verwendet.

### 3.6 Ligation von DNA

DNA-Fragmente wurden in 1 x T4-Ligasepuffer (40 mM Tris-HCl, pH 7,8 bei 25 °C, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT und 1,8 mM ATP, Thermo Fisher Scientific) mit 7,5 U T4-DNA Ligase (1,5 U/µl, Thermo Fisher Scientific) in einem Gesamtvolumen von 15 µl ligiert. Das Verhältnis von Vektor-DNA zu Insert-DNA betrug ca. 1:4 bis 1:5 (Vektor:Insert). Dabei erfolgte die Inkubation entweder zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C im Wasserbad. Anschließend wurde das Volumen auf 50 µl eingestellt und die DNA mit 1-Butanol gefällt (s. Abschnitt 3.7).

### 3.7 Fällung von DNA

Die DNA aus Ligationsansätzen wurde mit 1-Butanol gefällt. Der Ansatz wurde mit destilliertem Wasser auf 50 µl aufgefüllt und mit 500 µl 1-Butanol versetzt. Nach gründlichem Mischen und einem zehnminütigen Zentrifugationsschritt bei 12000 x g wurde das Präzipitat mit 70 % (v/v) eiskaltem Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 8 µl destilliertem H<sub>2</sub>O gelöst. Anschließend wurde der ganze Ansatz für eine Transformation elektrokompenter *E. coli*-Zellen verwendet (Abschnitt 2.8.3).

### 3.8 Sequenzierung von DNA

Zur Sequenzierung von DNA wurden etwa 720 - 1200 ng Plasmid-DNA und 18 ng pro 100 Bp. PCR-Fragment mit 30 pmol des jeweiligen Oligonukleotids in 12 µl Gesamtvolumen gemischt. Die Sequenzierung wurde dann nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977) von der Firma Seqlab (Göttingen) durchgeführt.

### 3.9 Konzentrationsbestimmung von DNA

Konzentrationen von DNA-Lösungen wurden mit dem ‚NanoDrop‘-Spektralphotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) bestimmt. 1 µl einer DNA-Lösung unbekannter Konzentration wurde auf die Messvorrichtung des Spektralphotometers gegeben und die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren anhand der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Eine Absorption von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Der Quotient aus der Absorption von 260 nm und 280 nm kann zur Reinheitsbeurteilung der Lösung herangezogen werden. Er sollte zwischen 1,5 und 1,9 liegen (Sambrook *et al.*, 1989).

### 3.10 Herstellung von *pBSS-Strep-T.aro-G.met* und *pASG-Strep-T.aro-G.met*

Zur Synthese der entsprechenden Plasmide *pBSS-Strep-T.aro-G.met* und *pASG-Strep-T.aro-G.met* wurden die Gene *bssA* und *bssB* aus dem Plasmid pJoe2775\_BSS-geo (Hilberg, 2012) mithilfe der Oligonukleotide P34 und P35 amplifiziert und mittels Kit gereinigt.

Die beiden Plasmide *pASG3bssStrep+ori1* (Hilberg, 2012) und *pBSS-Strep* (Hogg, 2008) wurden einem präparativen Restriktionsverdau mit NcoI unterzogen. Die erhaltenen 5'-Überhänge wurden mit S1-Nuklease (Thermo Fisher), die eine 5'-Exonukleaseaktivität besitzt, entfernt um *blunt ends* zu erhalten. Sowohl die Plasmide als auch das zuvor mit PCR erzeugte Amplifikat

wurden mit BamHI verdaut. Anschließend wurde das Amplifikat in die beiden Plasmide ligiert und der Ligationsansatz in *E. coli* transferiert.

Die aus DH5α isolierten Plasmide wurden Restriktionsanalysen mit EcoRV und Sequenzierungsreaktionen (Abschnitt 3.8) unterzogen, um ihre Korrektheit sicherzustellen.

**Tabelle 15:** Aus *E. coli* DH5α isolierte Plasmide. Diese wurden mit der Restriktionsendonuklease EcoRV verdaut und so einer Vorauswahl unterzogen. Als richtig identifizierte Kandidaten wurden mittels Sequenzierung (s. Abschnitt 3.8) eindeutig verifiziert.

Plasmide	Restriktionsenzym	Beschreibung/Erwartete Fragmente [Bp] <sup>a</sup>
pASG3bssStrep+ori1	EcoRV	4183, 4438
pASG-Strep-T.aro-G.met		2296, 2749, 3899, 4154

a: Bp = Basenpaare.

### 3.11 Vollständige und partielle Deletion des bss-Operons

Die in dieser Arbeit verwendeten pK19mobsacB-Derivate (Tabelle 10) wurden über Konjugation in *A. aromaticum* EbN1-SR7 transferiert (Abschnitt 2.8.5) und die Transformationsansätze auf Kanamycin-haltigem Medium ausplattiert. Von den Transformanden wurden Reinkulturen unter Chloramphenicol- und Kanamycin-Selektion angefertigt und mittels PCR auf die Integration des Konstrukts an die gewünschte Stelle ins Genom überprüft. Dabei wurde auch untersucht, ob die Integration im 5'- oder im 3'-Bereich des Zieloperons stattgefunden hatte (s. Ergebnisse). Klone, bei denen die Integration auf die eine oder die andere Weise mittels PCR nachgewiesen wurde, wurden ohne Selektionsdruck in zwei Passagen kultiviert und anschließend zur Negativselektion auf Saccharosehaltigem Medium ausplattiert. Da das auf den Plasmiden vorhandene *sacB*-Gen, welches für eine Levansucrase kodiert, dem Stamm eine Sensitivität gegenüber Saccharose verleiht, erfolgt ein zweites Rekombinationsereignis, bei dem das Plasmid aus dem Genom entfernt wird. Die erhaltenen Segreganden wurden mittels PCR daraufhin überprüft, ob und auf welche Weise das Vektorkonstrukt aus dem Genom heraus rekombiniert hatte.

## 4. Biochemische Methoden

### 4.1 Überproduktion von BSS in *Aromatoleum aromaticum* EbN1

Das Plasmid pASG3bssStrep+ori1 wurde über chemische Transformation in den *E. coli*-Stamm S17-1 und über Konjugation weiter in *A. aromaticum* EbN1-SR7 transferiert. Die Überproduktion der BSS erfolgte im 1-l-Maßstab nach Induktion mit AHT (Anhydrotetracyclin, Endkonzentration 0,43 µM) bei einer OD<sub>578</sub> von 1. Nach 24 Stunden Inkubation unter Agitation bei 28 °C erfolgte die Zellernte durch Zentrifugation (25 000 x g, 20 Minuten, 4 °C). Von den Kulturen wurden vor und 24 h nach der Induktion Proben von 1 ml Volumen entnommen und wie unter Abschnitt 4.2 beschrieben, weiterverarbeitet. Die anaerob geernteten Zellen wurden in 10 mM TEA/NaOH (Triethanolamin, pH 8) resuspendiert und mittels French®-Press-Zelle (Thermo Electron Corp., Waltham, MA, USA) aufgeschlossen. Das Lysat wurde eine Stunde bei 126 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Im erhaltenen Überstand wurde wie unter Punkt 5.3 die Aktivität der Benzylsuccinat-Synthase gemessen.

### 4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihren apparenten Molekülmassen erfolgte in denaturierenden 7 – 15 % SDS-Polyacrylamid-Gelen (Tab. 16) mithilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach (Laemmli, 1970) bei 16 mA im Sammelgel und 26 mA im Trenngel. Zur Auftrennung des Proteoms von Zellen wurde 1 ml Zellkultur bekannter optischer Dichte (OD<sub>578</sub>) fünf Minuten bei 15 000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in H<sub>2</sub>O dest. mit 1 µg/ml DNaseI aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde mit 4 x SDS-Probenpuffer (300 mM Tris, pH 6,8, 2,4 % SDS (w/v), 37,8 % (w/v) Glycerin, 30 % β-Mercaptoethanol, 0,0032 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt, um ein Volumen zu erhalten, das der optischen Dichte OD<sub>578</sub> von 10 der ursprünglichen Zellkultur entspricht. Bei Fraktionen aus einer Proteinreinigung wurden 25 µg Protein pro Tasche, bei gereinigtem Protein etwa 5 - 8 µg aufgetragen). Die Proben wurden fünf Minuten bei 98 °C gekocht, kurz auf Eis abgekühlt und anschließend 15 µl auf SDS-Polyacrylamid-Gele aufgetragen und die Gelelektrophorese in einem 1 x SDS-Laufpuffer (25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1 % SDS) bei Raumtemperatur durchgeführt. Als Proteinstandard wurde der „PageRuler Prestained Protein Ladder™“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mit Proteinfragmenten zwischen 170 und 10 kDa verwendet. Im

Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine im Trenngel entweder mit Coomassie-Färbelösung (0,25 % (w/v) Coomassie Blue R 250; 5 % (v/v) Essigsäure und 50 % (v/v) Ethanol) gefärbt und nicht proteingebundener Farbstoff mit Entfärber-Lösung (10 % (v/v) Ethanol, 7 % (v/v) Essigsäure) entfärbt, oder die Gele zum Immunoblotting weiterverwendet (Abschnitt 4.3).

**Tabelle 16:** Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Polyacrylamid-Gele zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen. Nach der Herstellung des Trenngels wird dieses in die Gelkammer gefüllt und zum Ausschluss von Sauerstoff mit H<sub>2</sub>O dest. oder 2-Propanol überschichtet. Nach dem Polymerisieren des Trenngels wird das H<sub>2</sub>O/2-Propanol entfernt, das Sammelgel in die Gelkammer gefüllt und der Kamm zur Formung der Auftragstaschen eingesetzt. PAA: Polyacrylamid; AA/BAA: Acrylamid/Bisacrylamid im Mischverhältnis von 37,5:1 (Rotiphorese Gel 30®, gebrauchsfertig, Carl Roth GmbH, Karlsruhe); SDS: Natriumdodecylsulfat; TEMED: Tetramethylethyldiamin; APS: Ammoniumperoxodisulfat.

Komponenten	7 % PAA-Trenngel	10 % PAA-Trenngel	15 % PAA-Trenngel	7 % PAA-Sammelgel
1 M Tris/HCl pH8,8	1,95 ml	1,95 ml	1,95 ml	-
1 M Tris/HCl pH 6,8	-	-	-	235 µl
H <sub>2</sub> O dest.	1,560 ml	1,058 ml	275 µl	1,27 ml
30 % AA/BAA	1,125 ml	1,627 ml	2,411 ml	480 µl
10 % SDS (w/v)	54,5 µl	54,5 µl	54,5 µl	20 µl
5 % TEMED	54,5 µl	54,5 µl	54,5 µl	20 µl
10 % APS	78 µl	78 µl	78 µl	40 µl

#### 4.3 Immunologischer Nachweis der BSS

Zum Nachweis der BSS in *A. aromaticum* wurden Proteome einzelner Stämme gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend durch die ‚Western-Blot‘-Methode (Towbin *et al.*, 1979) in einer ‚semi-dry‘-Elektroblotting-Kammer auf eine Nitrocellulose-Membran mit 0,2 µm Porengröße (Sartorius, Göttingen) übertragen. Die Membran wurde mit 50 ml 5 % Milchpulver (L3, Tabelle 17) in PBST (w/v) 1 Stunde geblockt. Anschließend erfolgten 3 Waschschrte mit 20 ml PBST (L2, Tabelle 17) für jeweils 5 Minuten. Zur Detektion der BSS wurden monoklonale α-Streptavidin-Antikörper, die an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt sind (StrepMAB-Classic HRP Conjugate, Strep-tag® II specific monoclonal antibody, IBA GmbH, Göttingen), in einer 1:4000-Verdünnung in 10 ml PBST (2,5 µl L4) verwendet. Die Inkubationszeit des Antikörpers mit der Membran betrug eine Stunde. Nach zwei weiteren Waschschrten mit PBST und einem Waschschrte mit 20 ml PBS erfolgte die Entwicklung des Western-Blots mit 20 ml PBS, 200 µl 3 % Chloronaphtollösung (L5) und 20 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (L6)



unter Agitation. Nach dem Auftauchen der Proteinbanden wurde die Entwicklungslösung entfernt und die Membran mit H<sub>2</sub>O dest. gewaschen.

**Tabelle 17:** Für die Immunodetektion mittels Western-Blot-Verfahren benötigte Lösungen.

	Lösung	Zusammensetzung
L1	PBS-Puffer, pH 7,4	4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 16 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 115 mM NaCl
L2	PBST-Puffer, pH 7,4	PBS-Puffer + 0,1 % (v/v) Tween 20
L3	5 % Milchpulver	2,5 g Milchpulver in 50 ml PBST
L4	„StrepMAB-Classic HRP-Konjugat“	α-Streptavidin-Antikörper, die an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt sind
L5	Chloronaphtol-Lösung	3 % (w/v) 4-Chloro-1-Naphtol in Methanol
L6	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung	30 % (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

#### 4.4 Reinigung der (R)-Benzylsuccinat Synthase

Die Reinigung der BSS mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie wurde unter strikt anaeroben Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden sowohl anaerobisierte Puffer als auch sämtliches Material (Ultrazentrifugenbecher, Strep-Tactin-Superflow-Säule, Plastikbecher, 50-ml-Reaktionsgefäße) mehrere Tage vor der Reinigung in ein Anaerobenzelt eingeschleust. *A. aromaticum*-Zellextrakt mit überproduzierter BSS wurde auf eine Strep-Tactin-Superflow-Säule (10 ml; IBA, Göttingen) aufgetragen. Diese wurde zuvor mit Grundpuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl) äquilibriert, der auch für die Herstellung des Zellextraktes verwendet wurde. Die Säule wurde nach Auftragen des Zellextraktes mit zwei Säulenvolumina Grundpuffer bei einer Flussrate von 1 ml min<sup>-1</sup> gewaschen. Anschließend wurde die Säule mit drei Säulenvolumen 0,5 M NaCl in Grundpuffer gewaschen, bevor erneut mit drei Säulenvolumina Grundpuffer gespült wurde. Nach diesen Waschschritten wurde durch Anlegen von Grundpuffer mit 2,5 mM D-Desthiobiotin reine BSS mit Strep-Tag eluiert. Die Säule wurde nach der Anwendung gemäß der Anleitung des Herstellers mit 1 mM HABA (2-(4-Hydroxyphenylazo)-Benzoat) regeneriert und bei 4 °C gelagert. Direkt im Anschluss an die Elution wurde das Protein mittels diskontinuierlichen Aktivitätstest auf seine Aktivität überprüft.

#### 4.5 Reinigung der Succinyl-CoA:Benzy succinat-CoA-Transferase (BbsEF) und der Succinyl-CoA-Dehydrogenase (BbsG)

Die Succinyl-CoA:Benzy succinat-CoA-Transferase BbsEF aus *Geobacter metallireducens* (Accession-Nr. WP\_011365841 und WP\_004511545) mit einem N-terminalen Strep-Tag wurde heterolog in *E. coli* DH5 $\alpha$  in LB-Medium überproduziert. Die Genexpression wurde bei einer OD<sub>578</sub> von 0,5 mit Anhydrotetracyclin (0,2  $\mu$ g/ml; 2 mg/ml in der Stammlösung) induziert. Die Zellen wurden für 14 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, bei 4 000  $\times$  g für zehn Minuten zentrifugiert und das Zellsediment in 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (Kavitation) mit anschließender Zentrifugation für eine Stunde bei 4 °C und 126 000  $\times$  g. Das Enzym wurde mittels Affinitätschromatographie über eine Streptavidin-Säule gereinigt. Die Elution erfolgte mit 100 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8) mit 2,5 mM Desthiobiotin mit einer Ausbeute von 1,25 mg BbsEF pro g Feuchtmasse der Zellen.

Benzy succinyl-CoA-Dehydrogenase (BbsG) aus *T. aromatica* (Accession-Nr. AAF89842) wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$ , die das Plasmid pTrc99aBbsG\_Taro (Leuthner, 1999) enthalten, überproduziert. Die Genexpression wurde mit 1 mM IPTG bei einer optischen Dichte von 1 bei 578 nm induziert. Nach einer vierstündigen Inkubation bei 30 °C wurden die Zellen mittels Zentrifugation bei 6000  $\times$  g und 4 °C für zehn Minuten geerntet. Das Zellpellet wurde in 10 mM Triethanolamin/NaOH-Puffer (pH 7.5) mit 10 % (w/v) Glycerin resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch 3 Passagen über eine French-Press-Zelle bei 110 MPa. Anschließend wurde das Lysat bei 126 000  $\times$  g für eine Stunde bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen Filter mit 0,2  $\mu$ m Porengröße filtriert, um den zellfreien Extrakt zu erhalten. Dieser Extrakt wurde auf eine ‚DEAE-Sepharose-Fast-Flow‘-Säule geladen, die mit zwei Säulenvolumina Puffer B gewaschen wurden. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0 bis 500 mM NaCl in Puffer B über 8 Säulenvolumina. Das Protein eluierte bei NaCl-Konzentrationen von 225 – 290 mM. Die Fraktionen, die eine Aktivität aufwiesen, zeigten eine gelbe Färbung, wurden vereinigt und mithilfe einer ‚Sartorius Stedim Vivaspin 20‘-Säule konzentriert. Nach Zugabe von 10 % Glycerin (w/v) erfolgte die Lagerung bis zur Verwendung bei -20 °C.

#### 4.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Rohextrakt von *T. aromatica* K172 und anderer Proteine wurde nach der Methode von Bradford *et al.* (1976) im 96-Well-Plattenreader bei 495 nm durchgeführt. Als Standardprotein für die Erstellung von Eichgeraden wurde Rinderserumalbumin (BSA; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) verwendet.

#### 4.7 Biochemische Umwandlung von Benzylsuccinat zu Phenylitaconyl-CoA

Die extrahierten doppelt markierten ( $^3\text{H}$  und  $^{14}\text{C}$ ) Benzylsuccinat-Proben (1 ml Portionen in 1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7) wurden mit 16  $\mu\text{mol}$  Succinyl-CoA in 6,5 ml einer 200  $\mu\text{M}$  Ferriceniumhexafluorophosphat-Lösung, 2 mM  $\text{MgCl}_2$  und 20 mM KCl gemischt. Der Reaktionsansatz wurde mit Wasser auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt und die Reaktion durch Zugabe von 1 U (250  $\mu\text{l}$ ) Succinyl-CoA:Benzylsuccinat-CoA-Transferase (BbsEF) und 1 U (1 ml) Benzylsuccinyl-CoA-Dehydrogenase gestartet (BbsG). Die Inkubation erfolgte über drei Stunden bei Raumtemperatur. Während der Inkubationszeit schlug die Farbe des Reaktionsansatzes von grün (blau durch das Ferriceniumion und gelb durch das BbsG) auf gelb um, was einen Hinweis auf die Reduktion des Ferriceniumhexafluorophosphat zu Ferroceniumhexafluorophosphat und der gleichzeitigen Bildung von Phenylitaconyl-CoA darstellte. Nach vollständiger Reaktion wurde der Ansatz schrittweise in 5 - 20  $\mu\text{l}$ -Portionen 5 M HCl auf einen pH-Wert von 1,5 eingestellt. Nach anschließender Zentrifugation wurde der Überstand auf eine zuvor vorbereitete Silica- $\text{C}_{18}$  – Säule geladen (s. Abschnitt 6.2). Nach erfolgter Elution wurde das Eluat über Nacht auf einer Heizplatte (80 °C) mittels Evaporation getrocknet. Der Rückstand wurde in 1,5 ml Wasser resuspendiert und 500  $\mu\text{l}$  dieser Lösung für eine nachfolgende Szintillationsmessung mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit gemischt (s. Abschnitt 5.5).

## 5. Analytische Methoden

#### 5.1 Herstellung von zellfreiem Extrakt von *T. aromatica* K172

*T. aromatica* – Zellen wurden in 2-L-Flaschen anaerob mit Toluol als Substrat bis zu einer  $\text{OD}_{578}$  von 3 – 4 kultiviert. Die Zellen wurden unter anaeroben Bedingungen mittels Zentrifugation bei  $6\,000 \times g$  und 4 °C für zehn Minuten geerntet. Die Zellsedimente (ca. 15 - 17 g

Feuchtmasse) wurden in 15 - 17 ml 10 mM Triethanolamin (pH 7,5) resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension drei Mal durch eine Kanüle mit einem Durchmesser von 1,2 mm und daraufhin mehrere Male durch eine Kanüle mit einem Durchmesser von 0,8 mm gedrückt, um eine vollständige Homogenisierung zu erreichen und so den anschließenden Zellaufschluss zu erleichtern. Dieser wurde durch dreimaliges Passagieren der Zellsuspension durch eine French-Press-Zelle bei 110 MPa erreicht. Schließlich wurden die Zellen bei 126 000  $\times$  g und 4 °C für eine Stunde zentrifugiert und der erhaltene Überstand (zellfreier Extrakt) für die EPR-Analysen (Abschnitt 5.2), Aktivitätsbestimmungen der BSS (Abschnitt 5.3) und die Umsetzung von chiralem Toluol (Abschnitt 5.5) verwendet.

### 5.2 Elektronenparamagnetische Resonanz-Spektroskopie (EPR-Spektroskopie)

Die EPR-Spektroskopie wurde im Institut für Zytobiologie in Marburg in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Antonio Pierik durchgeführt. Die Methode wurde verwendet, um Änderungen des Glycylradikalsignals der aktiven BSS im Rohextrakt von *T. aromatica* durch Zugabe bekannter Inhibitoren und anderer potentieller Effektor-Verbindungen zu verfolgen.

#### 5.2.1 Probenvorbereitung zur Messung von Glycylradikalsignalen

Die Probenvorbereitung für die Untersuchung von Glycylradikalsignalen im Rohextrakt von *T. aromatica* wurde ebenfalls unter strikt anaeroben Bedingungen in einem Anaerobenzelt durchgeführt. Dazu wurde Rohextrakt von anaerob auf Toluol gewachsenen *T. aromatica* Zellen (~ 80 mg/ml) für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit verschiedenen Effektor-Verbindungen (isotopenmarkierte und nicht-markierte Substrate/Inhibitoren) inkubiert. Alle Verbindungen wurden für EPR-spektroskopische Analysen in einer Endkonzentration von 2 mM mit Rohextrakt von anaerob auf Toluol gewachsenen *T. aromatica* Zellen inkubiert. Anschließend wurden die verwendeten EPR-Röhrchen mit 300  $\mu$ l Rohextrakt befüllt. Die EPR-Röhrchen wurden verschlossen, aus dem Anaerobenzelt entfernt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Messung darin gelagert.

#### 5.2.2 Ausrüstung und Messbedingungen

EPR-Spektren wurden an einem Bruker EMX-6/1 X-Band-EPR-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) aufgenommen. Die Messungen von Glycylradikalsignalen im Rohextrakt von *T. aromatica* wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Temperatur 70 K,

Mikrowellenleistung 13  $\mu$ W, Mikrowellenfrequenz 9,454 GHz, Modulationsfrequenz 100 kHz, Modulationsamplitude 1 mT. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit Hilfe des Programms WINEPR (Bruker, Karlsruhe).

### 5.3 Aktivitätsbestimmung der (R)-Benzylsuccinat Synthase

Die Bestimmung der Enzymaktivität nativer BSS wurde im Rohextrakt von auf Toluol gewachsenen *T. aromatica*-Zellen (70-85 mg  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>) in einem diskontinuierlichen Enzymtest durchgeführt. Alle Testansätze wurden unter strikt anaeroben Bedingungen durchgeführt und mittels RP-HPLC analysiert. Das gesamte Material und alle benötigten Stocklösungen (Substrate, Kosubstrate, 20 mM TEA/NaOH Puffer pH 8,0) wurden anaerobisiert und mehrere Tage vor der Durchführung der Tests in ein Anaerobenzelt eingeschleust. Für den Testansatz wurde der Rohextrakt in einem Gesamtvolumen von 1 ml 1:5 verdünnt und zunächst für zwei Minuten mit dem jeweiligen Kosubstrat (meist Fumarat) inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrates (Toluol, Ethylbenzol, 1-Fluormethylbenzol, 2-Fluortoluol, 3-Fluortoluol, 4-Fluortoluol, *o*-Cresol, *o*-Toluidin), welches zuvor in 2-Propanol gelöst wurde, gestartet. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0 Min., 2 Min., 4 Min., 8 Min., 16 Min.) wurden 100  $\mu$ l Proben genommen und die Reaktion durch Zugabe von 40  $\mu$ l 10 % (v/v) TFA (mit 8,75 mM Benzoat als internen Standard) gestoppt. Die Proben wurden nach Beendigung der Tests aus dem Anaerobenzelt ausgeschleust und säurepräzipitierte Proteine durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 13000 rpm entfernt. Der klare Überstand wurde in HPLC-Fläschchen gefüllt und auf die Produktbildung (Benzylsuccinat, Fluorbenzylsuccinat etc.) analysiert (Abschnitt 5.4).

### 5.4 Reversed-phase Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC)

Die Hochleistungschromatographie wurde angewandt, um (R)-Benzylsuccinat als Produkt der BSS-Reaktion aus dem Rohextrakt von *T. aromatica* nachzuweisen. Dazu wurde ein HPLC-System der Firma Agilent (Santa Clara, CA, USA) mit einem gekoppelten Dioden-Array-Detektor (UV DAD,) verwendet. Die Proben wurden über 20 Minuten unter Verwendung einer RP-C<sub>18</sub>-Säule (Kinetex 5u C<sub>18</sub>, 250 mm x 4,6 mm; Phenomenex, Aschaffenburg) aufgetrennt und bei den Wellenlängen 210 und 260 nm detektiert. Die Flussrate bei den beschriebenen Läufen betrug 0,75 ml  $\cdot$  min<sup>-1</sup>. Als interner Standard für die Quantifizierung der gebildeten Menge (R)-Benzylsuccinat wurde 2,5 mM Benzoat verwendet. Die Retentionszeit von Benzoat

betrug 5,6 Minuten, die von (*R*)-Benzylsuccinat ca. 6,5 Minuten. Die HPLC-Läufe wurden mithilfe der Software Agilent ChemStation ausgewertet.

### 5.5 Umsetzung von chiral markiertem Toluol

Zellfreier Extrakt von anaerob auf Toluol gewachsenen *T. aromatica*-Zellen mit BSS-Aktivitäten von  $10 - 20 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  (4 Ansätze) wurde mit 33 Bq  $^{14}\text{C}$ -markiertem Fumarat und 100 Bq von (*R*)- oder (*S*)- Toluol in 10 mM Triethanolamin/NaOH-Puffer (pH 7,5) über Nacht bei Raumtemperatur im Anaerobenzelt inkubiert. Die entstandenen [ $^3\text{H}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ]-markierten Benzylsuccinat-Enantiomere ( $0,32 - 0,54 \text{ } \mu\text{mol}$ ) wurden mittels Silica- $\text{C}_{18}$ -Säule extrahiert. Die Säulen wurden mit 0,1 % TFA/ $\text{H}_2\text{O}$  äquilibriert, bevor die Proben aufgeladen wurden. Anschließend wurden die Säulen mit einem Säulenvolumen 0,1 % TFA/ $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Die Benzylsuccinat-Enantiomere wurden im letzten Schritt mit einem Säulenvolumen 0,1 % TFA und 50 % Acetonitril eluiert. Die Eluate wurden über Nacht mithilfe einer Heizplatte bei  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  getrocknet und der Rückstand in 1,5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert. Proben von 500  $\mu\text{l}$  wurden entnommen und mit 5 ml Quicksafe A Szintillationsflüssigkeit (Zinsser) gemischt, um die Radioaktivität der Proben in einem Szintillationszähler („PerkinElmer Tri-Carb 2810 TR<sup>®</sup> Liquid Scintillation Analyser“) zu messen.

## 6. Chemische Methoden

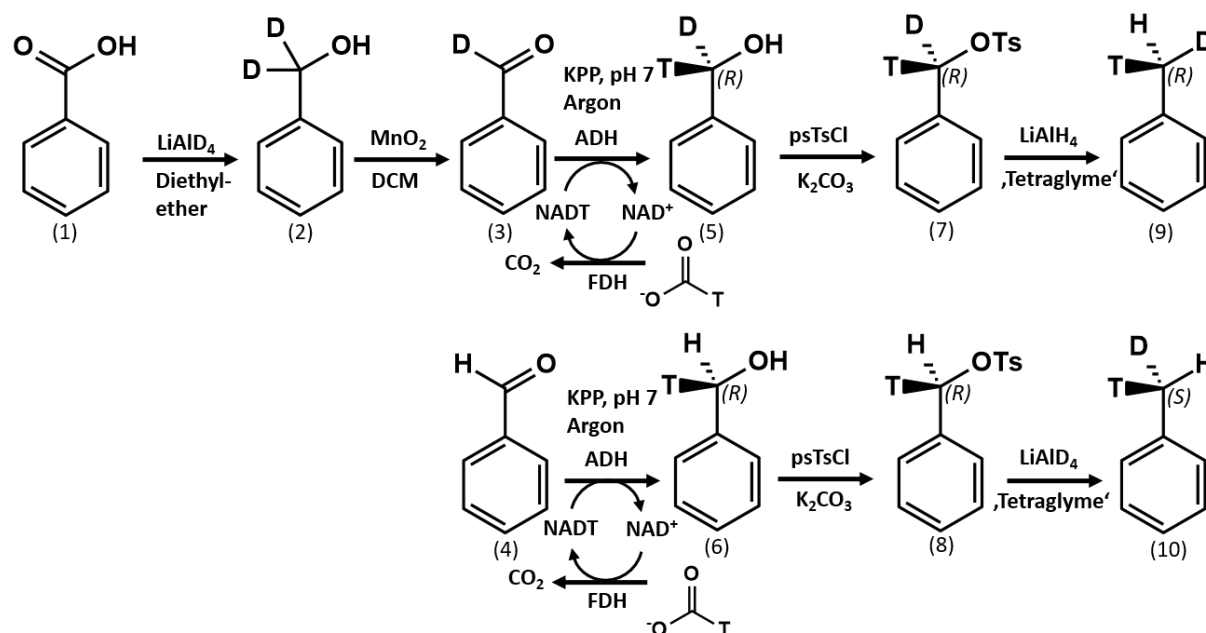
### 6.1 Synthese von chiralem Toluol

Die (*R*) – und (*S*)-Enantiomere von chiralem Toluol wurden von Dr. Peter Friedrich aus Benzaldehyd und  $1\text{-}^2\text{H}_1$ -Benzaldehyd hergestellt.  $1\text{-}^2\text{H}_1$ -Benzaldehyd wurde durch die Reduktion von Benzoesäure mit  $\text{LiAl-}[^2\text{H}]_4$  zu  $[1\text{-}^2\text{H}_2]$ -Benzylalkohol (99,3 %  $^2\text{H}$ , gemessen mit NMR), gefolgt von einer Oxidation mit  $\text{MnO}_2$  hergestellt. Beide Benzaldehyd-Isotopomere wurden in 100 mM K-Phosphatpuffer (pH 7,0) auf eine Konzentration von 14 mM gelöst und 0,24 mM  $\text{NAD}^+$  hinzugefügt. Die Lösungen wurden durch Durchgasen mit Argon für 20 Minuten anaerobisiert und für eine stereospezifische enzymatische Reduktion mit einer Alkoholdehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae* (3 U/50 ml) (Brenner *et al.*, 1985) einer Formiat-Dehydrogenase aus *Candida boidinii* (5 U/50 ml), und  $^3\text{H}$ -markiertem Natriumformiat (18,8 mM mit einer spezifischen Radioaktivität von 2,9 GBq/mol) in ein Anaerobenzelt mit 95

% N<sub>2</sub> und 5 % H<sub>2</sub> überführt. Die Reaktionen wurden für vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt, woraufhin weitere Portionen Enzyme nachgelegt und die Inkubation für drei Tage fortgesetzt wurden. Die Reaktionsansätze wurden zwei Mal mit Diethylether extrahiert und die vollständige Extraktion der markierten Produkte durch die Zugabe von 0,5 ml nichtmarkiertem Benzylalkohol, gefolgt von drei weiteren Extraktionsschritten sichergestellt. Die Extrakte wurden mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und evaporiert. Um die notwendige Menge an Anfangsmaterial für die nachfolgenden Syntheseschritte herzustellen, wurden die Produkte weiterhin mit 1,5 ml nichtmarkiertem Benzylalkohol verdünnt. Aufgrund der Stereospezifität der Alkoholdehydrogenase resultierte dies in der Synthese von spezifischem (*R*)-Enantiomer von [1-<sup>3</sup>H,1-<sup>1</sup>H]-Benzylalkohol (1,88 g = 17,4 mmol mit 380 kBq Radioaktivität) und [1-<sup>3</sup>H,1-<sup>2</sup>H]-Benzylalkohol (1,92 g = 17,7 mmol mit 170 kBq Radioaktivität). Die Benzylalkoholisomere wurden zu den entsprechenden Tosylaten umgewandelt, indem sie mit 10 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 30 mmol *p*-Toluolsulfonylchlorid (5,72 g) in einem Mörser gemischt und 30 Minuten zerrieben wurden. Überschüssiges *p*-Toluolsulfonylchlorid wurde durch die Zugabe von 100 mmol KOH (5,6 g) und 15-minütiges Zerreiben entfernt. Die gewünschten Tosylat-Produkte wurden aus den zerriebenen Feststoffen durch wiederholte Zugabe von Diethylether und anschließender Filtration extrahiert. Nach Evaporierung der Ether bei Unterdruck wurden die Tosylate als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 3,14 g (12 mmol; 67,4 %) für (*R*)-[1-<sup>3</sup>H,1-<sup>1</sup>H]-Benzylalkoholtosylat und 1,88 g (11,4 mmol; 65,6 %) für (*R*)-[1-<sup>3</sup>H,1-<sup>2</sup>H]-Benzylalkoholtosylat erhalten. Schließlich wurden die Tosylate in Tetraethylenglykoldimethylether („Tetraglyme“, Siedepunkt 275 °C) gelöst (~ 1,5 M), auf 0 °C im Eisbad gekühlt und vorsichtig mit einem geringen Überschuss (13 mmol) von LiAl[<sup>2</sup>H]<sub>4</sub> (für das (*R*)-[1-<sup>3</sup>H,1-<sup>1</sup>H]-Isomer) bzw. LiAlH<sub>4</sub> (für das (*R*)-[1-<sup>3</sup>H,1-<sup>2</sup>H]-Isomer) gemischt. Die Reaktionsansätze wurden auf Raumtemperatur abgekühlt und dann unter Vakuum auf 50 - 60 °C erhitzt, was die selektive Destillation der zwei Enantiomere des chiralen markierten Toluols (*R*)-Toluol aus der Reaktion mit LiAlH<sub>4</sub> und (*S*)-Toluol aus der Reaktion mit LiAl[<sup>2</sup>H]<sub>4</sub> zur Folge hatte (Tabelle 18).

**Tabelle 18:** Ausbeute aus der Synthese von (*R*)-Toluol und (*S*)-Toluol.

Enantiomer	Ausbeute	Radioaktivität	spez. Radioaktivität
( <i>R</i> )-Toluol	0,45 g $\pm$ 4,8 mmol	38,9 kBq	8,1 kBq/mmol
( <i>S</i> )-Toluol	0,51 g $\pm$ 5,4 mmol	32,2 kBq	6,0 kBq/mmol



**Abbildung 10:** Synthese von chiralem (*R*)- und (*S*)-Toluol.  $\text{LiAlD}_4/\text{LiAlH}_4$ : Lithiumaluminium-Deuterat/-Hydrat, DCM: Dichlormethan ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), ADH/FDH: Alkohol-Dehydrogenase und Formiat-Dehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae*,  $p\text{TsCl}$ : *p*-Toluolsulfonylchlorid; „Tetraglyme“: Tetraethylenglykoldimethylether, (1): Benzylalkohol, (2):  $[1\text{-}^2\text{H}_2]$ -Benzylalkohol, (3):  $[1\text{-}^2\text{H}]$ -Benzaldehyd; (4): Benzaldehyd; (5): (*R*)- $[1\text{-}^3\text{H}, 1\text{-}^2\text{H}]$ -Benzylalkohol, (6): (*R*)- $[1\text{-}^3\text{H}, 1\text{-}^1\text{H}]$ -Benzylalkohol, (7): (*R*)- $[1\text{-}^3\text{H}, 1\text{-}^2\text{H}]$ -Benzylalkoholtosylat, (8): (*R*)- $[1\text{-}^3\text{H}, 1\text{-}^1\text{H}]$ -Benzylalkoholtosylat; (9): (*R*)-Toluol; (10): (*S*)-Toluol.

## 6.2 Chemische Synthese von Succinyl-CoA und Benzylsuccinyl-CoA

7,36 mg (73,6  $\mu\text{mol}$ ) Succinylanhydrid wurde in 1 ml Acetonitril und 50 mg (60,9  $\mu\text{mol}$ ) Coenzym A in 2 ml 1 M  $\text{NaHCO}_3$  gelöst. Die beiden Lösungen wurden gemischt und mit Wasser auf 10 ml Gesamtvolumen verdünnt. Der Ansatz wurde eine Stunde auf Eis inkubiert. Um den Reaktionsfortschritt zu überprüfen, wurden 10  $\mu\text{l}$ -Portionen des Ansatzes entnommen und mit 10  $\mu\text{l}$  Ellmanns-Reagenz (20 mg DTNB, 30 mg  $\text{KHCO}_3$  in 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) auf einem Filterpapier gemischt. Ein Ausbleiben eines gelben Farbumschlags signalisierte die vollständige Umsetzung zu Succinyl-CoA. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 5 M HCl bis zu einem pH-Wert von 1,5 gestoppt. Der Ansatz wurde entgast und das gebildete Succinyl-CoA anschließend über eine Silica- $\text{C}_{18}$  – Säule gereinigt. Die Säulen wurden mit 0,1 % TFA/ $\text{H}_2\text{O}$  äquilibriert, bevor die Proben aufgeladen wurden. Anschließend wurden die Säulen mit einem Säulenvolumen 0,1 % TFA/ $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Das Succinyl-CoA wurde im letzten Schritt mit einem Säulenvolumen 0,1 % TFA und 50 % Acetonitril eluiert.



Benzylsuccinyl-CoA wurde nach der Methode von Schachter und Taggart (1953) chemisch synthetisiert. Dazu wurde Benzylsuccinat (384  $\mu\text{mol}$ ) in 800  $\mu\text{l}$  Essigsäure bei 80 °C gelöst. Anschließend wurde Essigsäureanhydrid (384  $\mu\text{mol}$ ) hinzugegeben. Die Temperatur wurde auf 120 °C erhöht und die Reaktion so lange inkubiert, bis die Essigsäure vollständig verdampft ist. Als Produkt entstand beim Abkühlen festes Benzylsuccinylanhydrid. Um den entsprechenden Thioester herzustellen, wurde das Anhydrid in 1,5 ml Acetonitril gelöst und der Ansatz mit 50 mg Coenzym A, welches in 2 ml 1 M  $\text{NaHCO}_3$  gelöst wurde, gemischt. Der Ansatz wurde mit 7 ml  $\text{H}_2\text{O}$  aufgefüllt. Um den Fortschritt der Reaktion zu überprüfen, wurde Ellmanns-Reagenz wie oben beschrieben verwendet. Bei Ausbleiben der Gelbfärbung wurde die Reaktion mithilfe von 5 M  $\text{HCl}$  auf einen pH-Wert von 1,5 eingestellt. Der Ansatz wurde daraufhin entgast und wie oben auf eine zuvor vorbereitete Silica- $\text{C}_{18}$  – Säule gegeben und gereinigt.

Durch Messung der Extinktion bei 259 nm ( $\epsilon = 15,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) wurde die Thioesterkonzentration in den einzelnen Fraktionen bestimmt. Die Fraktionen des Eluats wurden in 2  $\mu\text{mol}$ -Portionen bei -80 °C für 30 Minuten eingefroren. Anschließend wurde restliches Acetonitril mittels SpeedVac-Zentrifugation (Savant) entfernt, bis das Volumen um die Hälfte verringert war. Die Aliquots wurden ein weiteres Mal bei -80 °C eingefroren, um sie anschließend mithilfe von Lyophilisation zu trocknen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

## VI. Ergebnisse

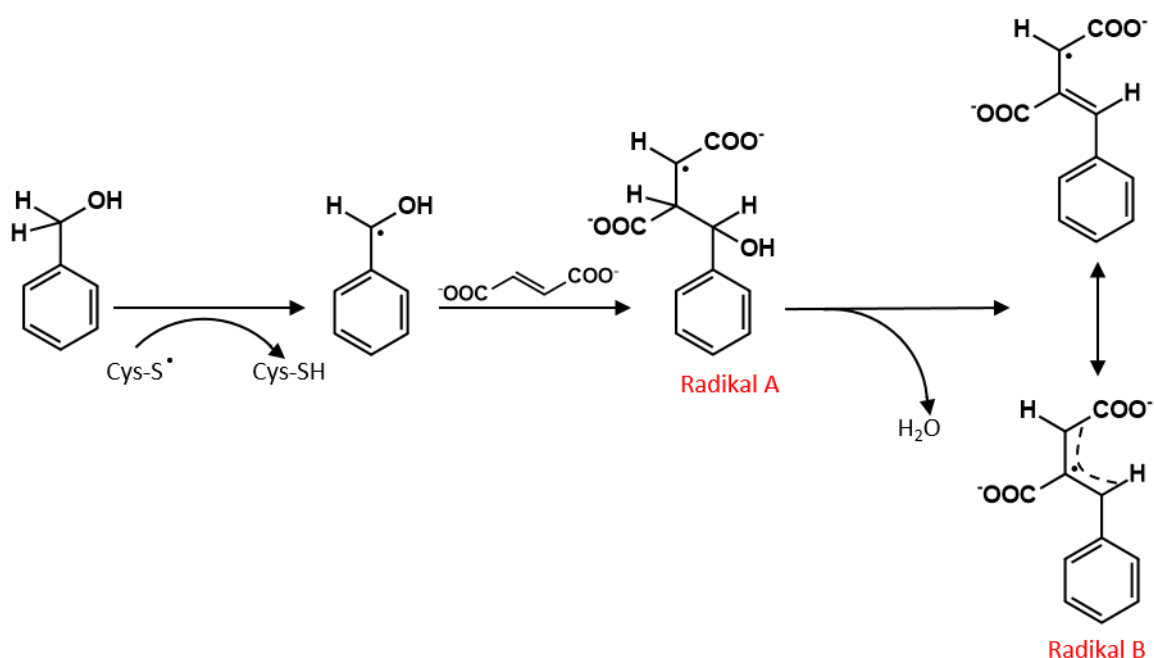
### 1. EPR-spektroskopische Analyse von *Thauera aromatica* K172-Rohextrakt

Glycylradikalenzyme zeigen bei EPR-spektroskopischen Untersuchungen ein charakteristisches Spektrum, anhand dessen sie sich eindeutig identifizieren lassen. Die Kopplung des ungepaarten Elektrons mit dem Kern des Wasserstoffatoms am C2 des Glycylradikals bewirkt eine Aufspaltung des EPR-Signals. Die Detektion dieser charakteristischen Aufspaltung im EPR-Spektrum weist auf das Vorhandensein des aktivierten BSS-Enzyms hin. In der Dissertation von Markus Hilberg (2012) wurden zahlreiche isotopenmarkierte und nicht-markierte Substrate, Kosubstrate, Inhibitoren und weitere potentielle Effektorverbindungen daraufhin getestet, ob sich in ihrer Anwesenheit das EPR-Spektrum ändert, was auf die Erzeugung einer neuen Radikalspezies hinweist. Die Verbindungen wurden dabei hauptsächlich nach ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu den Substraten ausgewählt, um ihre Reaktion mit der BSS zu eventuellen neuen Zwischenprodukten zu ermöglichen. In der Dissertation von Knut Verfürth (2005) wurden z.B. bereits Benzylalkohol, Benzaldehyd und Phenylhydrazin als potente Inhibitoren der Benzylsuccinatsynthase identifiziert. EPR-Studien von Markus Hilberg (2012) zeigten dann bereits, dass die Zugabe von Benzaldehyd, aber vor allem von Benzylalkohol bemerkenswerte Änderungen des Glycylradikalspektrums bewirkt. Das resultierende Spektrum wurde einer organischen Radikalspezies zugeordnet und lieferte anhand der Kopplungskonstanten Hinweise auf zwei bis drei stark koppelnde Protonen. Da Benzaldehyd nur eine geringe Änderung des Spektrums bewirkte, konzentrierte sich Markus Hilberg in seinen weiteren Studien auf Benzylalkohol als Inhibitor. Neben Benzylalkohol und Fumarat wurden in seiner Arbeit erste Experimente mit deuteriertem Fumarat und  $^{13}\text{C}$ -markierten Benzylalkohol durchgeführt (Abb. 12). Hierbei wurde der Nachweis erbracht, dass die Bildung der neuen organischen Radikalspezies sowohl von Benzylalkohol, als auch von Fumarat abhängig ist. Weiterhin postulierte Markus Hilberg einen Mechanismus, der in der möglichen Bildung zweier verschiedener organischer Radikalspezies resultiert, die jeweils aus Benzylalkohol und Fumarat gebildet werden und für die Veränderung des EPR-Spektrums verantwortlich sein könnten (Abb. 11). Eine mögliche Erklärung ist, dass durch Abstrahierung eines Wasserstoffatoms vom C1-Atom des Benzylalkohols durch die BSS dieses zunächst zu einem Benzylalkohol-Radikal aktiviert wird, das dann an die Doppelbindung von Fumarat addiert, was

in einem 2-(Hydroxymethylphenyl)succin-3-yl-Radikal resultiert (Radikalspezies A, Abb. 11). An diesem Punkt scheint die Reaktion stehenzubleiben, d.h. die abschließende Rück-Abstraktion des H-Atoms vom Cys des aktiven Zentrums zum Produktradikal funktioniert mit den Inhibitoren nicht mehr. Durch eine anschließende Wassereliminierung könnte das zunächst gebildete Radikal A auch weiter zu einem mesomeriestabilisierten Allyl-Radikal überführt werden (Radikalspezies B, Abb. 11). Anhand der von Markus Hilberg dargestellten Ergebnisse konnten die gebundenen Radikalspezies in Benzylalkohol-inhibierter BSS im Rahmen seiner Dissertation nicht genauer identifiziert werden. Die zusammen mit Markus Hilberg und Prof. Dr. Antonio Pierik konzipierten und im Folgenden aufgezählten weiterführenden Experimente sind Bestandteil dieser Arbeit (Tabelle 19).

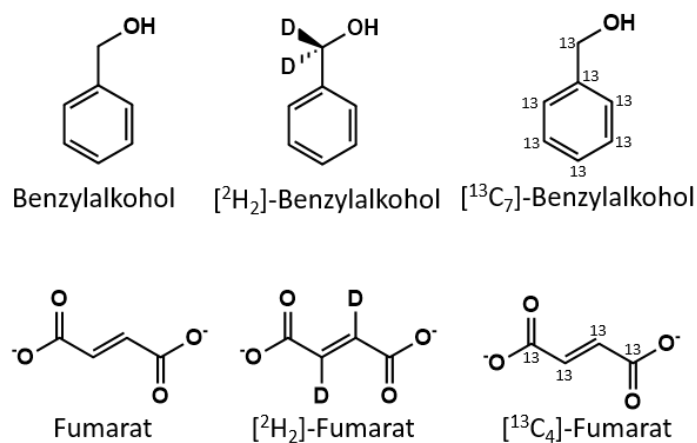
**Tabelle 19:** Weiterführende Experimente

	Inkubation des Extraktes mit...
1	[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-Benzylalkohol zusammen mit Fumarat, nach Austausch des Rohextrakt-Lösemittels gegen H <sub>2</sub> O
2	[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-Benzylalkohol zusammen mit Fumarat, nach Austausch des Rohextrakt-Lösemittels gegen D <sub>2</sub> O
3	Benzylalkohol zusammen mit [1,2,3,4- <sup>13</sup> C, 2,3- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-Fumarat
4	Benzylalkohol zusammen mit [1,2,3,4- <sup>13</sup> C]-Fumarat
5	[ <sup>13</sup> C <sub>7</sub> ]-Benzylalkohol zusammen mit [2,3- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-Fumarat



**Abbildung 11:** Möglicher Mechanismus zur Bildung eines Produktradikals mit Benzylalkohol und Fumarat. Benzylalkohol wird durch die Abstraktion eines Wasserstoffatoms vom C1-Atom zu einem Benzylalkohol-Radikal aktiviert. Die anschließende Addition an die Doppelbindung des Fumarats resultiert in der Bildung eines

2-(Hydroxymethylphenyl)-succin-3-yl-Radikals (Radikal A). Durch Wassereliminierung könnte ein mesomeriestabilisiertes allylisches Radikal entstehen (Radikal B).



**Abbildung 12:** Benzylalkohol und Fumarat in nicht deuterierter, deuterierter und <sup>13</sup>C-Form.

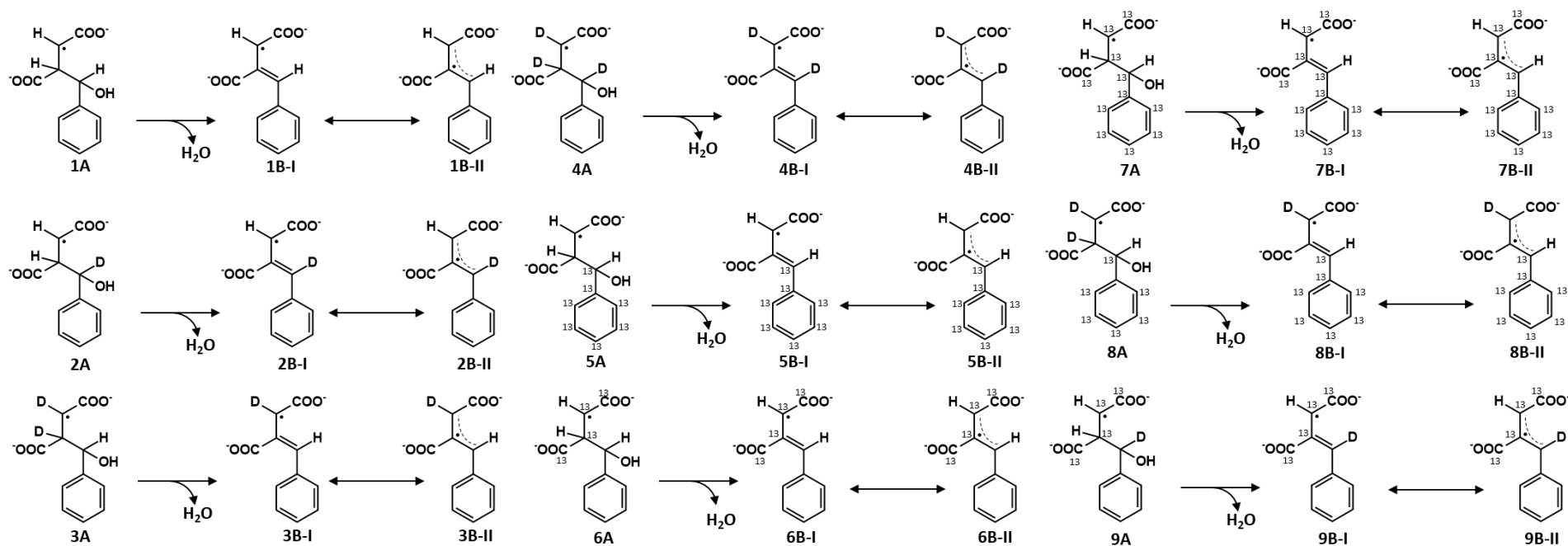
Bei der Inkubation des zellfreien Extrakts mit Toluol und Fumarat kommt es zu keiner Änderung des Glycylradikalspektrums, da das Gleichgewicht der normalen Reaktionen der BSS mit Produkten oder Substraten jeweils stark auf der Seite des freien Enzyms mit dem Glycylradikal liegt (Abb. 14, Spektrum 1). Gibt man Benzylalkohol ohne zusätzliches Fumarat zum Ansatz, kommt es bereits zu einer kleinen Änderung des Spektrums hin zum Spektrum eines organischen Radikals, selbst wenn der Extrakt vorher entsalzt wurde (Abb. 14, Spektren 2 und 13). Wird Fumarat dann ebenfalls extern zugegeben, entsteht ein Spektrum, welches eindeutig als organisches Radikalspektrum zu identifizieren ist (Abb. 14, Spektren 3 und 14). Wie Markus Hilberg in seiner Dissertation bereits beobachtet hat, ist die Bildung des Radikals also offensichtlich abhängig von Benzylalkohol und Fumarat. Die beobachtete Änderung des EPR-Spektrums allein durch Zugabe von Benzylalkohol kann man wohl dadurch erklären, dass auch nach der Entsalzung immer noch geringe Mengen an Fumarat an der BSS gebunden waren. Die Verwendung von [2H<sub>2</sub>]-Fumarat bewirkt das Verschwinden jeglicher Kopplung mit Protonen in der organischen Radikalspezies, sodass nur noch ein isotropes EPR-Spektrum beobachtet und auch dadurch die Bildung des Produktradikals bestätigt wird. (Abb. 14, Spektren 4 und 15).

Diese Beobachtung schließt die Entstehung von Radikalspezies 3B praktisch aus und ist ein Hinweis auf das Vorhandensein von Radikalspezies 3A (Abb. 13). Wäre Spezies 3B-II aus dieser Reaktion hervorgegangen, könnte das Radikal immer noch mit dem Wasserstoffatom koppeln, welches am Phenylrest sitzt. Untermuert wird diese These durch Versuche, in denen [2H<sub>2</sub>]-

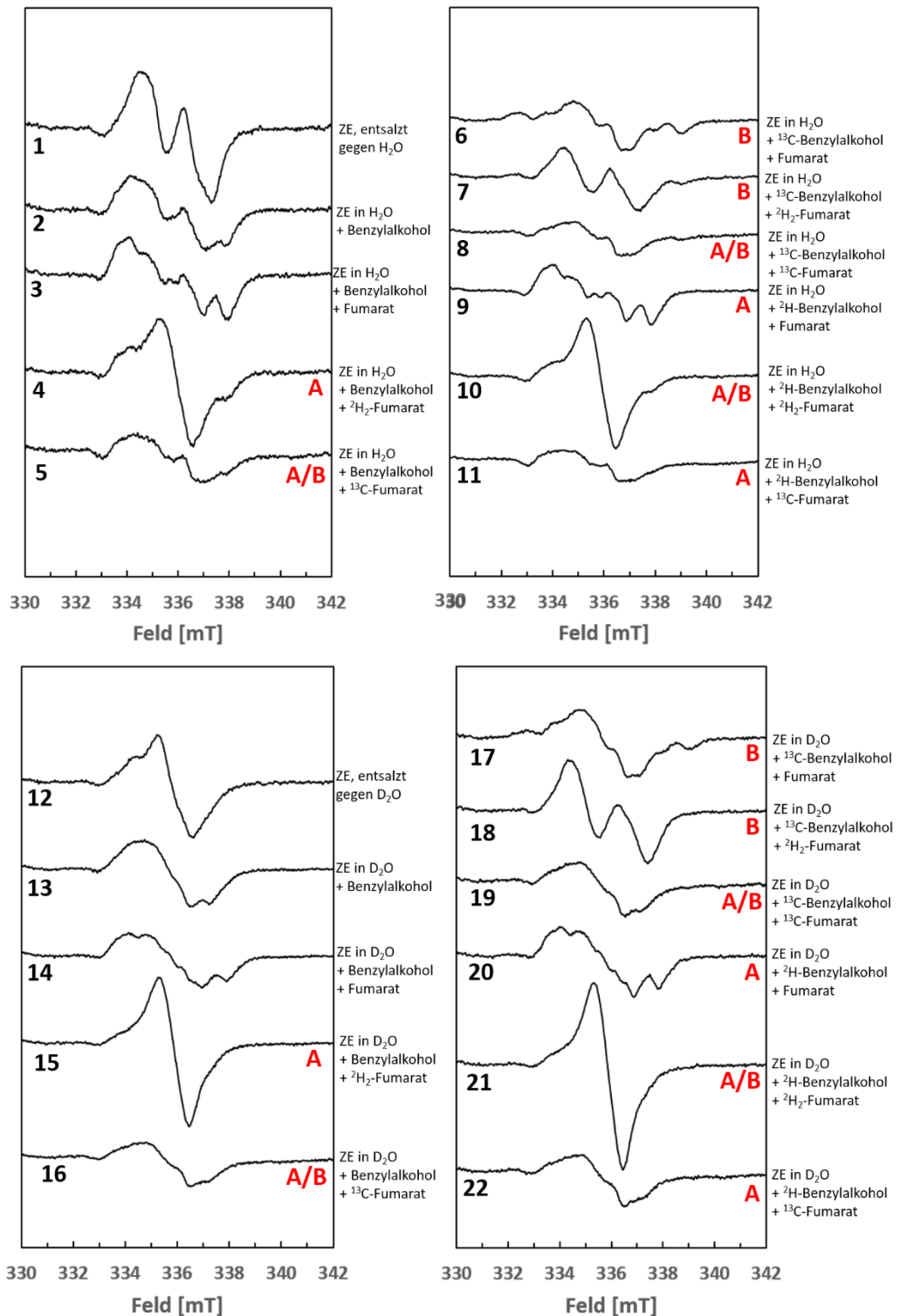
Benzylalkohol mit normalem Fumarat kombiniert wurde (Abb. 14, Spektren 9 und 20). Dass die Kopplung nach wie vor vorhanden ist, lässt sich nur durch das Entstehen von Radikalspezies 2A (Abb. 13) erklären, da das Radikal mit den Wasserstoffatomen am Succinatrest koppeln kann. Die Ergebnisse bei der Verwendung von [ $^{13}\text{C}_7$ ]-Benzylalkohol werfen allerdings insofern Fragen auf, als dass die entstehenden Spektren wiederum nicht einfach mit Radikalspezies 5A in Einklang zu bringen sind.

Die Spektren 7 und 18 in Abb. 14, bei denen [ $^{13}\text{C}_7$ ]-Benzylalkohol mit [ $^2\text{H}_2$ ]-Fumarat kombiniert wurde, weisen auf eine  $^{13}\text{C}$ -Kopplung mit einer Ordnungsgröße, wie man sie für ein delokalisiertes, allylisches Radikal (Radikalspezies B, Abb. 11) erwarten würde, hin. Die zwei breiten Kopplungen, wie sie in den Spektren 3 und 9 (Abb. 14) zu erkennen sind, legen hingegen die Existenz des lokalisierten Adduktradikals der Radikalspezies A (Abb. 11) nahe.

Somit weisen die Ergebnisse fast aller Versuche auf die Existenz von Radikalspezies A hin. Lediglich jene Spektren, bei denen [ $^{13}\text{C}_7$ ]-Benzylalkohol verwendet wurde, lassen sich nicht ohne weiteres durch diese Radikalspezies erklären.



**Abbildung 13:** Mögliche Produkte beim Einsatz von Benzylalkohol und Fumarat in deuterierter und nicht deuterierter Form. 1A//1B-I/1B-II: Radikalspezies A bzw. B entstanden aus Benzylalkohol und Fumarat; 2A//2B-I/2B-II: Radikalspezies A bzw. B, entstanden aus  $[^2H]$ -Benzylalkohol und Fumarat; 3A//3B-I/3B-II: Radikalspezies A bzw. B entstanden aus Benzylalkohol und  $[^2H_2]$ -Fumarat; 4A//4B-I/4B-II: Radikalspezies A bzw. B, entstanden aus  $[^2H]$ -Benzylalkohol und  $[^2H_2]$ -Fumarat. 5A//5B-I/5B-II: Radikalspezies A bzw. B, entstanden aus  $[^{13}C_7]$ -Benzylalkohol + Fumarat. 6A//6B-I/6B-II: Radikalspezies A bzw. B, entstanden aus Benzylalkohol +  $[^{13}C_4]$ -Fumarat. 7A//7B-I/7B-II: Radikalspezies A bzw. B, entstanden aus  $[^{13}C_7]$ -Benzylalkohol +  $[^{13}C_4]$ -Fumarat. 8A//8B-I/8B-II: Radikalspezies A bzw. B, entstanden aus  $[^{13}C_7]$ -Benzylalkohol +  $[^2H_2]$ -Fumarat. 9A//9B-I/9B-II: Radikalspezies A bzw. B, entstanden aus Benzylalkohol +  $[^{13}C_4]$ -Fumarat.

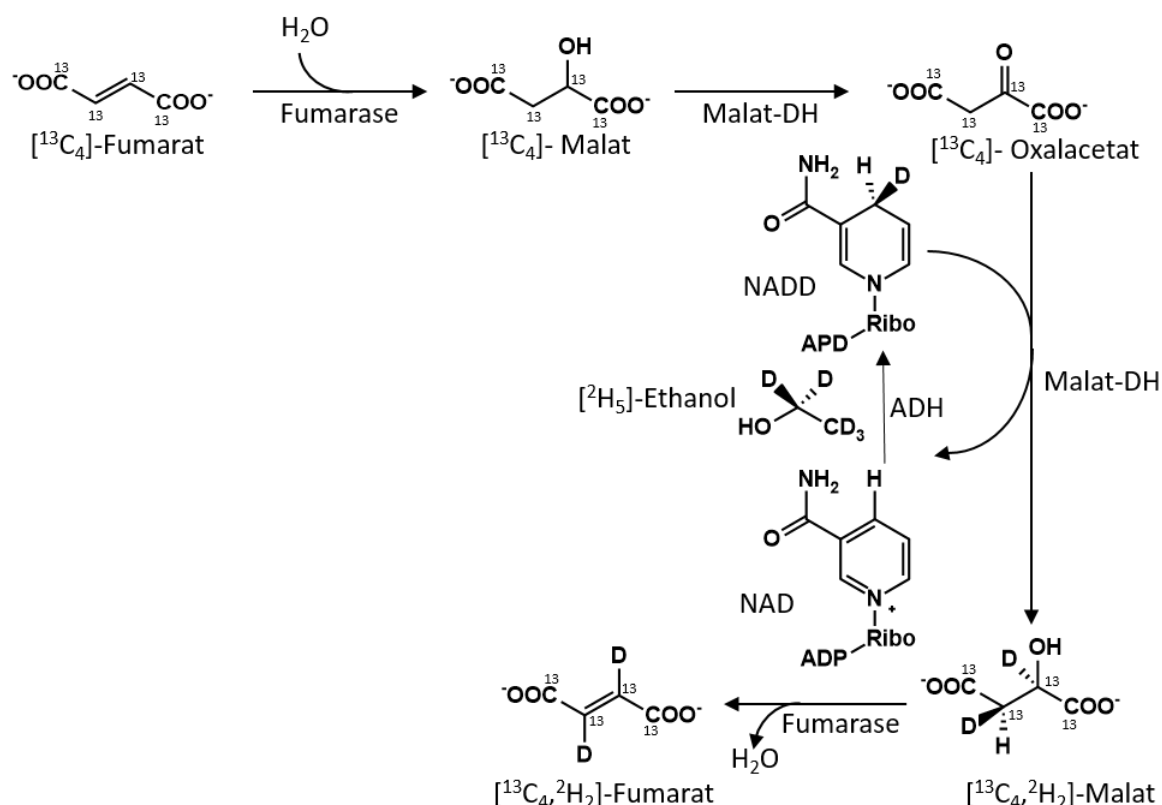


**Abbildung 14:** Einfluss von isotopenmarkiertem und nicht markiertem Benzylalkohol und Fumarat auf das Glycylradikalspektrum der Benzylsuccinat-Synthase. *T. aromatica*-Rohextrakt wurde zunächst mithilfe einer C<sub>18</sub>-Säule und H<sub>2</sub>O bzw. D<sub>2</sub>O als Eluent entsalzt und anschließend in verschiedenen Ansätzen für 20 Minuten mit Benzylalkohol und Fumarat inkubiert. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend EPR-spektroskopisch analysiert. Messbedingungen: Temperatur: 77 K, Mikrowellenleistung 13  $\mu$ W, Mikrowellenfrequenz 9,454 GHz, Modulationsfrequenz 100 kHz, Modulationsamplitude 1 mT. Proteinkonzentration des Rohextrakts:  $\sim$  80 mg/ml, BSS-Aktivität: 20 mU/mg Protein.

Die dargestellten Experimente wurden mehrmals wiederholt, um mögliche Probenverwechselungen auszuschließen. Die Gründe, warum die Versuche mit [ $^{13}\text{C}_7$ ]-Benzylalkohol zu den übrigen Beobachtungen widersprüchliche Ergebnisse liefern, sind nicht bekannt. Die Spektren 5, 8, 10, 16, 19 und 21 (Abb. 14) lassen keine eindeutigen Rückschlüsse auf die eine oder andere Radikalspezies zu. Bei 5 und 8 bzw. 16 und 19 wurde jeweils [ $^{13}\text{C}_4$ ]-Fumarat verwendet. Um besser aufzulösen, welche Radikalspezies gebildet wird, wurde versucht, [ $^{13}\text{C}_4$ ]-markiertes Fumarat zu deuterieren, da dieses kommerziell nicht erhältlich ist (Abb. 15). Die resultierenden EPR-Spektren zeigen keinen Unterschied zu nicht deuteriertem [ $^{13}\text{C}_4$ ]-Fumarat (Daten nicht gezeigt), sodass davon ausgegangen werden muss, dass die Deuterierung trotz mehrerer Versuche nicht funktioniert hat. Durch die starke Hyperfeinkopplung der  $^{13}\text{C}$ -Kerne des Fumarats wird das Spektrum zudem so breit, dass nur sehr schwer ein Unterschied zu erkennen wäre, unabhängig davon, welches Radikal entstehen würde.

Die gezeigten EPR-Spektren liefern somit keinen eindeutigen Hinweis auf die ausschließliche Existenz einer der beiden Radikalspezies. Es fällt jedoch auf, dass Radikalspezies B nur dann beobachtet wurde, wenn [ $^{13}\text{C}_7$ ]-Benzylalkohol in der Reaktion involviert war und alle anderen Spektren sich durch das Vorhandensein von Radikalspezies A erklären lassen (Abb. 11). Ein ganz eindeutiges Gegenargument gegen Radikalspezies B ist aber die fehlende Kopplung des H-Atoms am  $^{13}\text{C}$ -Atom von [ $^{13}\text{C}_7$ ]-Benzylalkohol. Somit bleibt die Frage zu klären, welche Erklärung es für die starke Kopplung des  $^{13}\text{C}$ -Kerns in der sehr wahrscheinlich auftretenden Radikalspezies A geben könnte.





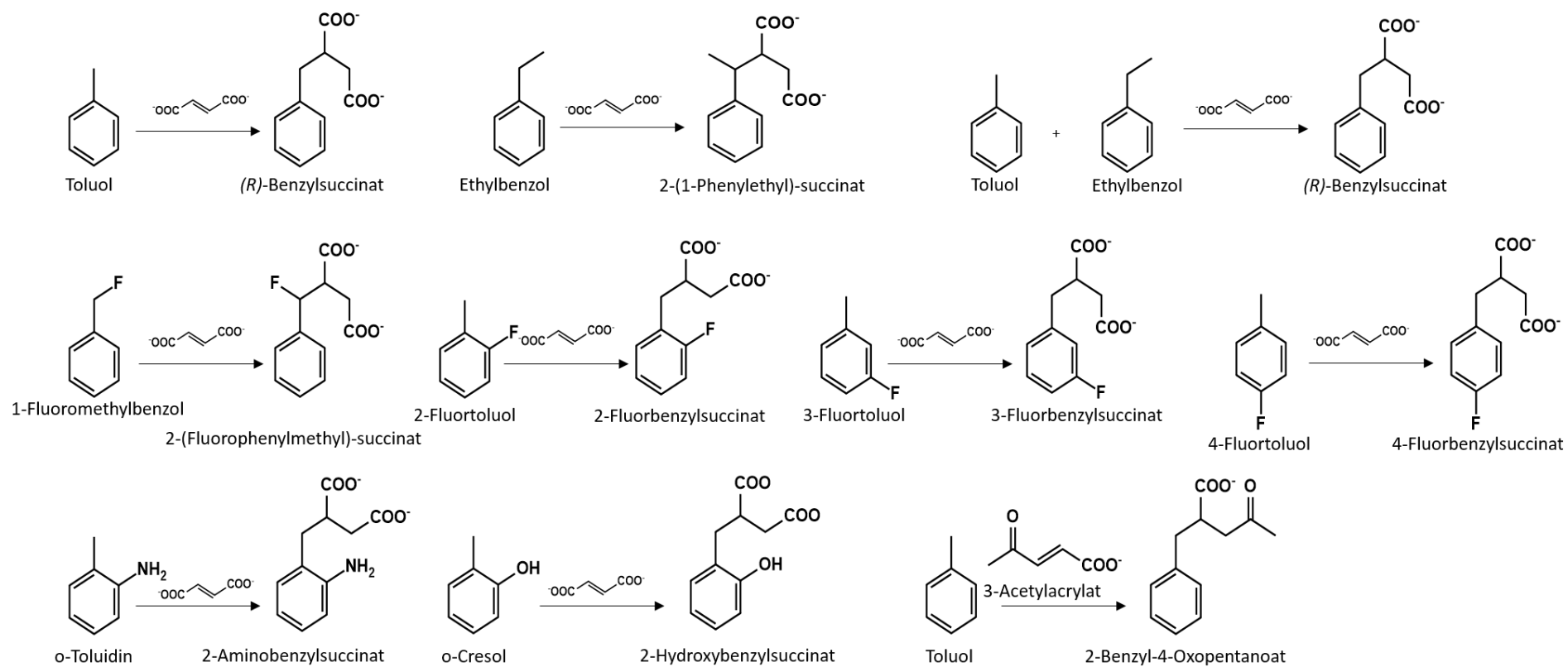
**Abbildung 15:** Deuterierung von  $[^{13}\text{C}_4]$ -Fumarat mithilfe von deuteriertem Ethanol.  $[^{13}\text{C}_4]$ -Fumarat soll durch die Fumarase zu  $[^{13}\text{C}_4]$ -Malat und dieses anschließend durch die Malat-Dehydrogenase zu  $[^{13}\text{C}_4]$ -Oxalacetat umgewandelt werden. Durch die gleichzeitige Reaktion von NAD und deuteriertem Ethanol durch die Alkoholdehydrogenase soll das Gleichgewicht der Reaktion in Richtung  $[^{13}\text{C}_4, ^2\text{H}_2]$ -Fumarat geschoben werden.

## 2. Bestimmung der BSS-Enzymaktivität mit verschiedenen Substraten

Um weitere Informationen bezüglich des Reaktionsmechanismus der BSS zu erhalten, wurden Aktivitätsmessungen mit aktivierter BSS in *T. aromatica*-Rohextrakt unter Einsatz verschiedener Substrate durchgeführt (Abb. 16). Bei der Verwendung von 1-Fluormethylbenzol, welches an der Methylgruppe ein Fluoratom anstelle eines Wasserstoffatoms trägt und für diese Arbeit von Dr. Marta Drozdowska synthetisiert wurde, war im HPLC-Spektrum ein verminderter Peak im Vergleich zur Toluolkontrolle zu erkennen. Eine Berechnung der Aktivität in dieser Probe erbrachte lediglich noch 14 % der Aktivität der Kontrolle mit Toluol als Substrat. Gleiches zeigte sich bei den kommerziell erhältlichen Fluortoluol-Derivaten 2-Fluortoluol, 3-Fluortoluol und 4-Fluortoluol, wo durch verminderten Anstieg eines Peaks im Verlauf der Inkubationszeit im Vergleich zur Kontrolle Aktivitäten von 22 % für 2-Fluortoluol, 36 % Fluortoluol und 17 % für 4-Fluortoluol suggeriert wurden. Wurde Ethylbenzol verwendet, war keine zeitabhängige Peakbildung im Chromatogramm zu beobachten.

Der einzige sich bildende Peak bei der Verwendung der Fluortoluolderivate war allerdings bei der gleichen Retentionszeit zu finden (6,5 Minuten), wie dies für Benzylsuccinat der Fall wäre. Vergleiche von Benzoat mit Fluorbenzoat zeigten, dass das zusätzliche Fluoratom eine Verminderung der Retentionszeit um knapp eine Minute bewirkt (Karola Schühle, persönliche Mitteilung), sodass der Peak eines eventuell sich bildendes Produktes unter dem Peak von Benzoat (interner Standard bei jeder Messung), welcher zu Konzentrationsberechnungen herangezogen wird, verborgen bleibt. Bei der Verwendung von Ethylbenzol sollte die Retentionszeit des Produktes 2-(1-Phenylethyl)-succinat (Abb. 16) länger als die von Benzylsuccinat sein. Trotz des Austausches des Rohextrakt-Lösemittels gegen H<sub>2</sub>O ist sehr wahrscheinlich übrig gebliebenes Toluol für die zeitabhängige Bildung des Peaks, hervorgerufen durch Benzylsuccinat, verantwortlich.

Durch die Verwendung alternativer Substrate wären wahrscheinlich verminderte Aktivitäten im Vergleich zu Toluol aufgrund von beispielsweise sterischer Hinderung zu erwarten. Die zusätzlichen Gruppen am Benzolring des Toluols könnten die korrekte Positionierung des Substrats in der Bindetasche der  $\alpha$ -Untereinheit der BSS beeinträchtigen. Marie Lippert erhielt für *o*-Toluidin mit einer Aminogruppe in ortho-Stellung zum Toluol (Abb. 16) Aktivitäten von 9 – 13 % der Kontrolle mit Toluol als Substrat (Lippert, 2009). Knut Verfürth konnte für *o*-Cresol mit einer Hydroxylgruppe an gleicher Stelle jedoch eine ähnliche Aktivität wie für Toluol erzielen (96 %) (Verfürth, 2005). Versuche, in dieser Arbeit die beiden Substrate umzusetzen, waren nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Ethylbenzol ist durch die zusätzliche Methylengruppe offenbar so groß, dass es weder als Substrat (0 % Aktivität) noch als Inhibitor des Enzyms (100 % Aktivität mit Toluol als Substrat) fungiert (Daten nicht gezeigt). Es stellt sich deshalb die Frage, durch welche Aminosäuren diese Substratspezifität erzeugt wird und ob diese sich verändern lassen, um das Substratspektrum der Benzylsuccinat-Synthase in *T. aromatica* zu erweitern.

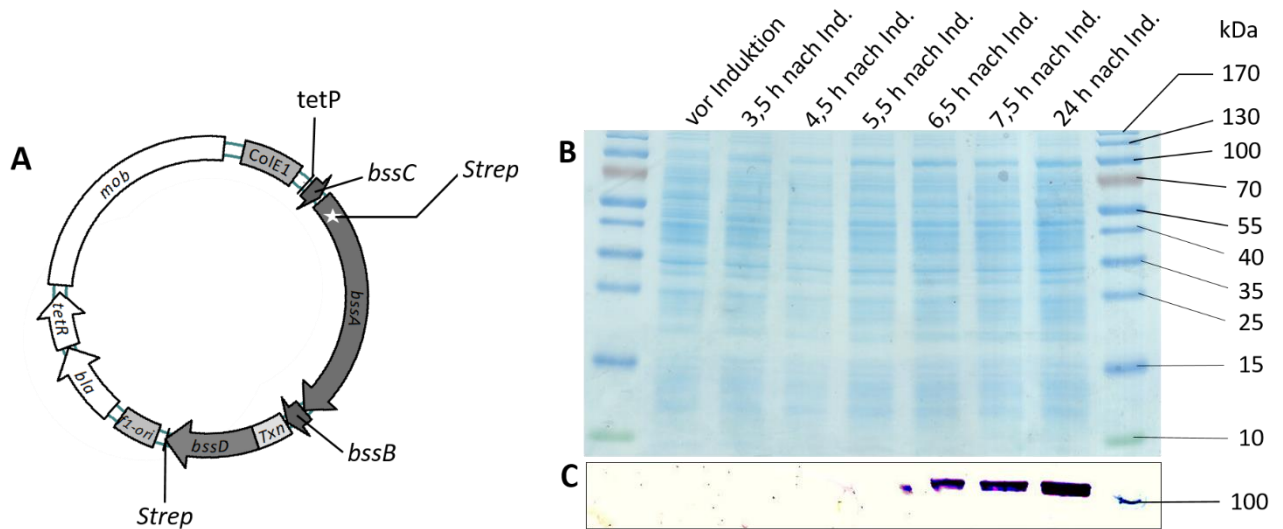


**Abbildung 16:** Mögliche Umsatzreaktionen getesteter Verbindungen, die Ähnlichkeiten zu Toluol oder zu Fumarat (3-Acetylacrylat) aufweisen.

### 3. Heterologe Überproduktion der Benzylsuccinat-Synthase in *Aromatoleum aromaticum* EbN1-SR7

Der in dieser Arbeit für biochemische Untersuchungen der Benzylsuccinat-Synthase verwendete Organismus *T. aromatica* K172 ist genetisch bislang nicht zugänglich. Ein naher Verwandter dieses Stamms *A. aromaticum* EbN1-SR7 (Wöhlbrand & Rabus, 2009) lässt sich durch Konjugation mit *E. coli* genetisch verändern. Dabei ist es sowohl möglich, Plasmide in *trans* zu exprimieren, als auch über *suicide*-Plasmide Genomabschnitte zu inaktivieren oder zu deletieren.

Vorangegangene Arbeiten zeigten bereits die Empfindlichkeit der Benzylsuccinat-Synthase von *T. aromatica* und verwandten Stämmen gegenüber Sauerstoff (Verfürth, 2005, Feil, 2006, Hogg, 2008, Lippert, 2009, Hilberg, 2012). Dies erschwerte eine native Reinigung der Benzylsuccinat-Synthase. Aus diesem Grund wurden die Strukturgene für die BSS, *bssC*, *bssA* und *bssB* und das des aktivierenden Enzyms *bssD* hintereinander in die ‚*broad-host-range*‘-Vektoren pASG3\_mob- und pASG3\_mob+ kloniert (Hilberg, 2012). Dabei ist die große  $\alpha$ -Untereinheit am N-Terminus mit einem Streptavidin-Tag versehen. An den N-Terminus des BssD-Proteins wurde ein Thioredoxin-Tag fusioniert, der die Löslichkeit des Proteins erhöhen sollte. Auch am C-Terminus des BssD-Proteins ist ein Streptavidin-Tag angeheftet. Die angehängten Streptavidin-Tags sollen die Reinigung der BSS vereinfachen und beschleunigen und ermöglichen darüber hinaus einen einfachen Nachweis der BSS mithilfe des Western-Blotting-Verfahrens mit Antikörpern gegen Strep-Tactin, die mit einem Meerrettich-Peroxidase-Konjugat (HRP-Konjugat) gekoppelt sind. Die Strukturgene der BSS und das Gen für das aktivierende Enzym stehen unter der Kontrolle eines mit Anhydrotetracyclin induzierbaren *tet*-Promotors. Dieser Promotor ermöglicht die Produktion des BSS-Proteins ohne das Vorhandensein von Toluol. So ist es möglich, *A. aromaticum* EbN1-SR7 mit Benzoat als Wachstumssubstrat zu kultivieren und daraus BSS zu erhalten, was wesentlich unkomplizierter ist als eine Anzucht mit Toluol als Wachstumssubstrat.

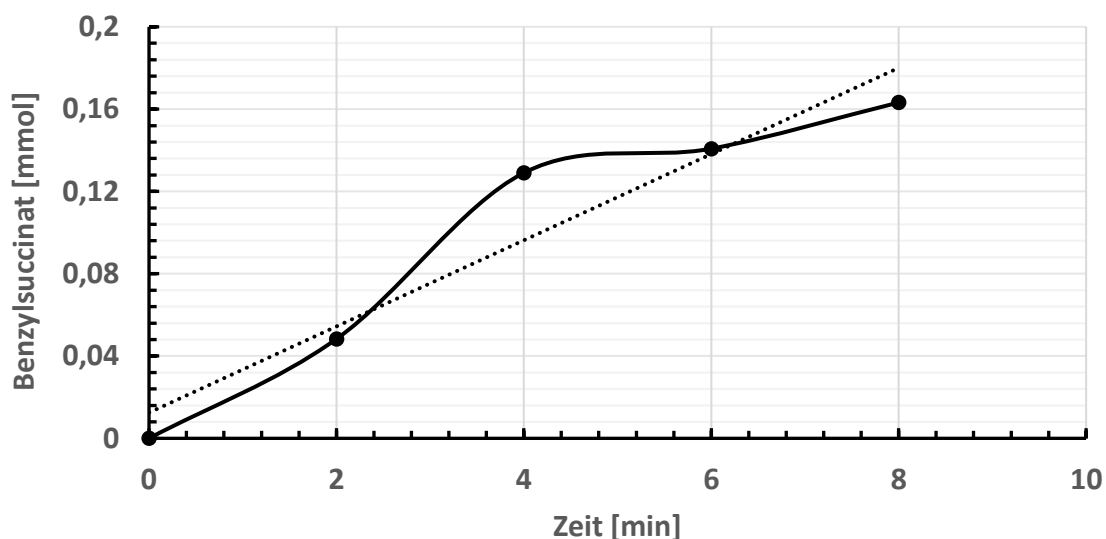


**Abbildung 17:** Heterologe Überproduktion von BSS aus *T. aromatica* K172 in *A. aromaticum* EbN1-SR7. A: Das Plasmid pASG3bssStrep+ori1 wurde für die Überproduktion einer Strep-getaggen BSS verwendet. Die Induktion erfolgte mittels Anhydrotetrazyklin durch das *tet*-Promotorsystem. B: SDS-PAGE entnommener Proben der Zellkultur während der Inkubation. Knapp oberhalb der 100 kDa-Bande des Größenstandards nimmt die Intensität einer Bande mit fortlaufender Inkubationsdauer zu. C: Western-Blot-Detektion mit einem  $\alpha$ -Streptavidin-Antikörper, um die gebildete BSS nachzuweisen. Die sichtbare Doppelbande weist auf die *in vivo*-Aktivierung der BSS durch das ebenfalls überproduzierte Aktivierungsenzym BssD hin.

Zur heterologen Überproduktion der BSS aus *T. aromatica* K172 wurde *A. aromaticum* EbN1-SR7 verwendet, in den das Plasmid pASG3bssStrep+ori1 mittels Konjugation eingebracht wurde. Bei der anschließenden Kultivierung in drei 1-L-Flaschen wurde die Expression der *bss*-Gene beim Erreichen einer  $OD_{578}$  von 1 mit AHT (200  $\mu$ g/l Kultur) induziert (Material und Methoden, Abschnitt 4.1). Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 28 °C für 24 Stunden. Es war zu beobachten, dass im Laufe der Inkubation die Signalstärke einer Bande auf Höhe der 100 kDa-Bande des Größenstandards zunahm (Abb. 17B). Um zu zeigen, dass es sich bei dieser Bande um die große  $\alpha$ -Untereinheit der BSS, die vom *bssA*-Gen kodiert wird, handelte, wurde eine Western-Blot-Analyse mit einem Anti-Strep-Antikörper durchgeführt. Es ist festzustellen, dass auch hier die Bande auf Höhe der 100 kDa-Bande des Größenstandards auszumachen war und eine Zunahme im Lauf der Inkubationszeit zu beobachten war (Abb. 17C). Es lässt sich also sagen, dass es sich bei der beobachteten Bande um die  $\alpha$ -Untereinheit der BSS handeln musste. Darüber hinaus ist festzustellen, dass bei der Verwendung eines niedrigprozentigen SDS-Polyacrylamidgels (7 % Acrylamid/Bisacrylamid) eine Doppelbande erkennbar wurde (Abb. 17 B und C). Kommt die aktivierte Benzylsuccinat-Synthase mit Sauerstoff in Kontakt,

wird sie am Glycylradikal oxygenolytisch gespalten, was in der Bildung einer Doppelbande resultiert. Dabei muss das Protein zuvor aktiviert worden sein. Es lässt sich also sagen, dass auch das Protein BssD gebildet wurde und eine für die Aktivierung von BssA ausreichende Aktivität aufwies.

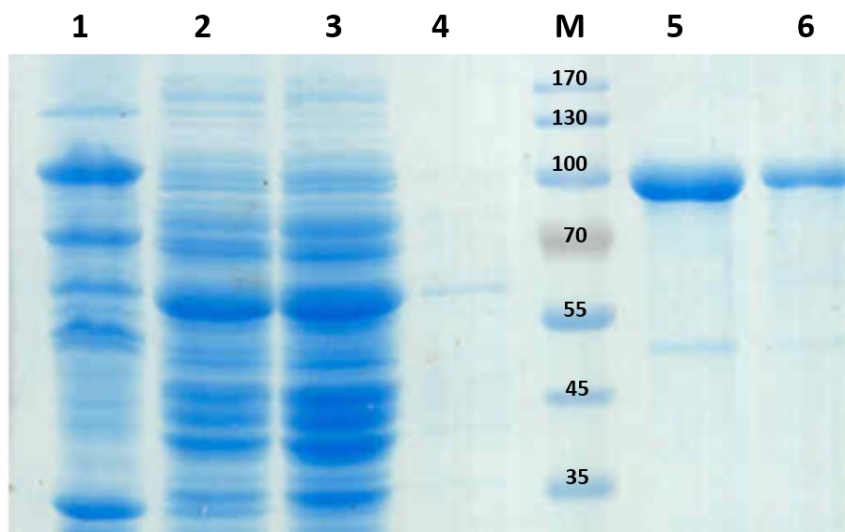
Aus der Zellkultur mit heterolog überproduzierter BSS wurde zellfreier Extrakt hergestellt (Material und Methoden, Abschnitt 4.1), um einen diskontinuierlichen Enzymtest mittels HPLC-Analyse durchzuführen (Material und Methoden, Abschnitte 5.3 und 5.4). Der Zellextrakt wurde dazu mit Fumarat und Toluol inkubiert und nach 0, 2, 4, 6 und 8 Minuten Proben entnommen, die durch *reversed phase*-HPLC auf die Bildung von Benzylsuccinat untersucht wurden (Abb. 18 und Abb. 36 im Anhang). Dabei wurde im Laufe der Inkubationsdauer mit einer spezifischen Aktivität von  $7,2 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  Protein eine Benzylsuccinat-Menge von 0,16 mmol gebildet.



**Abbildung 18:** Bildung von Benzylsuccinat im Rohextrakt von *A. aromaticum* EbN1-SR7 mit heterolog überproduzierter BSS aus *T. aromatica* K172. In einem diskontinuierlichen Enzymtest wurden nach 0, 2, 4, 6 und 8 Minuten Proben aus der Reaktion von Toluol und Fumarat im Rohextrakt genommen und über HPLC auf Produktbildung untersucht.

Im Anschluss wurde die Benzylsuccinat-Synthase aus dem erhaltenen zellfreien Extrakt anaerob mittels Streptavidinsäule gereinigt (Abb. 19) und daraufhin mit gereinigtem Protein ein weiterer diskontinuierlicher Enzymtest durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Dabei war keine messbare BSS-Aktivität zu verzeichnen. Der Versuch einer *in vitro*-Aktivierung der  $\alpha$ -Untereinheit der BSS blieb in der Vergangenheit bisher größtenteils erfolglos (Verfürth, 2005;

Feil, 2006; Hogg, 2008; Lippert, 2009). Die messbare BSS-Aktivität im Rohextrakt von auf Benzoat gewachsenen *A. aromaticum* EbN1-SR7-Zellen ohne Kontakt zu Toluol kann nur auf die heterolog überproduzierte BSS zurückzuführen sein. Die hier gezeigte Überexpression der *bss*-Strukturgene mit anschließendem Nachweis eines *in vivo* aktivierten Proteins und tatsächlich messbarer Aktivität im Rohextrakt stellt daher einen wichtigen Schritt bei der Aufklärung des Mechanismus der BSS dar.



**Abbildung 19:** Reinigung von BSS-Strep aus *A. aromaticum* EbN1-SR7 mit heterolog überproduzierter BSS aus *T. aromatica* K172. 1: Zellextrakt, 2: Durchfluss, 3: erste Waschfraktion, 4: zweite Waschfraktion, 5: erste Elutionsfraktion, 6: zweite Elutionsfraktion. M: Größenstandard in kDa (Prestained PAGE Ruler, Thermo Scientific).

Die unkomplizierte Kultivierung von *A. aromaticum* EbN1-SR7 auf Benzoat und die effektive Überproduktion einer aktiven Benzylsuccinat-Synthase bereitet damit den Weg für bequem durchführbare Mutagenesestudien der BSS und ihres putativen aktiven Zentrums.

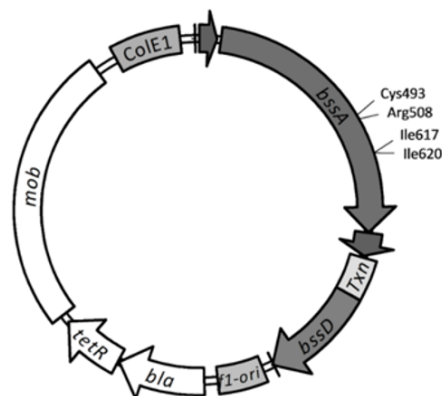
#### 4. Mutagenese der $\alpha$ -Untereinheit der Benzylsuccinat-Synthase

Die Identifizierung zahlreicher möglicher Schlüsselaminosäuren für den Mechanismus der BSS von Bharadwaj *et al.* (2013), Funk *et al.* (2015) und Szaleniec & Heider (2016), die durch hydrophobe Interaktion oder durch Wasserstoffbrückenbindung für die Bindung der beiden Substrate verantwortlich sind, liefert zahlreiche Angriffspunkte für die Erzeugung möglicher Mutanten.

Vergleiche mit nah verwandten Enzymen der BSS lassen die Annahme zu, dass eine gezielte Veränderung von Schlüsselamino­säuren in der Bindetasche des Enzyms zu einer Erweiterung des engen Substratspektrums der BSS von *T. aromatica* K172 führen könnte. Gleichzeitig würde ein Verlust messbarer Aktivität im Rohextrakt, wie sie für das Wildtypenzym gezeigt werden konnte, Aminosäuren, die an der Reaktion beteiligt sind, eindeutig identifizieren.

Die in Abbildung 20 hervorgehobenen Aminosäuren wurden für erste Studien ausgewählt und die *bssA*-Sequenz auf dem Plasmid pASG3bssStrep+ori1 (Abb. 20) durch PCR so verändert, dass die resultierenden Codons für andere Aminosäuren kodieren. Darüber hinaus wurden Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen eingefügt, um eine anschließende Identifizierung der veränderten Plasmide zu erleichtern (Tab. 20). Zusätzlich wurden entsprechend vorausgewählte Plasmide sequenziert und die veränderten Codons zweifelsfrei nachgewiesen.

	482	500	501	522	607	625
<i>T. aromatica</i> K172	PEEAHYWVNVLCMAPGLAG	RRKAQKTR	SEGGSAIFPAKLLE	SEQPNGWHNPITTS	VAGNS	
<i>T. aromatica</i> DNT-1	DEEAHNWVNVLCMSPGIHG	RRKTQKTR	SEGGGSIFPAKLLE	SEQPNGWHNPITTT	VAAANS	
<i>T. aromatica</i> T1	DEEAHNWVNVLCMSPGIHG	RRKTQKTR	SEGGGSIFPAKLLE	SEQPNGWHNPITTT	VAAANS	
<i>Azoarcus</i> sp. CIB	DEEAHNWVNVLCMSPGLHG	RRKTQKTR	SEGGSSVFPKVLLE	SEQPNAWHNEVTT	VAAANS	
<i>A. aromaticum</i> EbN1	PEEAHYWVNVLCMAPGVAG	RRKAQKTR	SEGGSAIFPAKLLE	SEQPNGWHNPITTT	VAGNS	
<i>A. toluoclasticus</i>	DEEAHNWVNVLCMSPGIHG	RRKTQKTR	SEGGGSIFPAKLLE	SEQPNGWHNPITTT	VAAANS	
<i>Azoarcus</i> sp. T	DEEAHNWVNVLCMSPGLHG	RRKTQKTR	SEGGSSVFPKVLLE	SEQPNAWHNEVST	VAAANS	
<i>G. metallireducens</i>	DDEAHYWGLVLCMSPGVCG	RRKTHKTR	SEGGGSIFPAKMME	SEQPNGWHNPITTT	VAAANS	



**Abbildung 20:** Für die Mutagenese ausgewählte Schlüsselamino­säuren. In einem Sequenzalignment von BssA (oben) zwischen mehreren nah verwandten *T. aromatica*-, *Azoarcus* sp.- und *A. aromaticum*-Stämmen wurden die Aminosäurereste Cys493, Arg 508, Ile617 und Ile620 hervorgehoben, deren Codons im Rahmen dieser Arbeit im Plasmid pASG3bssStrep+ori1 (unten) verändert wurden (Tab. 20).

### Mutagenese des Cysteinrestes Cys493 zu Selenocystein

Das Codon UGC, welches für den Cysteinrest C493, der mit seinem Thiyl-Radikal direkt an der Abstrahierung des Wasserstoffatoms von der Methylgruppe des Toluols beteiligt ist, wurde



durch die Stoppcodons UAG bzw. UGA ersetzt (Tab. 20). So sollte der Einbau eines Selenocysteins anstelle des Cysteins erreicht werden (Abb. 21).

Zur Rekodierung des UGA-Stoppcodons zum Einbau von Selenocystein ins Protein sind *cis*- und *trans*-aktive Faktoren notwendig. Zu den *cis*-aktiven Faktoren gehören das UGA-Stoppcodon auf der mRNA und das SECIS-Element, eine in für Selenoproteine kodierenden mRNAs vorhandene Sekundärstruktur, (Selenocystein-Insertions-Sequenz (Berry *et al.*, 1991, Forchhammer *et al.*, 1989)), während die mit Selenocystein beladene Selenocystein-spezifische tRNA (Sec-tRNA<sup>Sec</sup>) und ein Selenocystein-spezifischer Translationsfaktor SelB (Forchhammer *et al.*, 1989) zu den benötigten *trans*-aktiven Faktoren gehören. SelB zeigt in seiner N-terminalen Domäne eine signifikante Sequenzähnlichkeit zum kanonischen Translationsfaktor EF-Tu und besitzt ebenfalls GTPase-Aktivität (Forchhammer *et al.*, 1989).

In *E. coli* wird die Selenocystein-spezifische tRNA<sup>Sec</sup> von der Seryl-tRNA-Synthetase (SerRS) mit L-Serin beladen (Leinfelder *et al.*, 1988). Die Selenocystein-Synthase (kodiert durch *selA*) wandelt den Seryl-Rest in einen Selenocysteyl-Rest um.

Die Sekundärstruktur des SECIS-Elements (Baron *et al.*, 1993, Heider *et al.*, 1992) und der spezifische Translationsfaktor SelB sind für den Einbau des Selenocysteins in das Protein nötig. Das Stoppcodon wird über einen Quaternärkomplex aus SelB, GTP, Selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> und dem SECIS-Element am Ribosom rekodiert. Dabei bindet zunächst SelB mit seiner C-terminalen Domäne an das SECIS-Element, was in einer Konformationsänderung resultiert, die SelB die Interaktion mit dem Ribosom ermöglicht (Hüttenhofer & Böck, 1998, Baron *et al.*, 1993). Durch eine anschließende GTP-Hydrolyse dissoziiert der Komplex (Hüttenhofer & Böck, 1998) und Selenocystein wird in das Protein inseriert.

EF-Tu erkennt normalerweise weder Sec-tRNA<sup>Sec</sup> noch Ser-tRNA<sup>Sec</sup>. Allerdings wurde kürzlich berichtet, dass entsprechende synthetische Sec-tRNAs (tRNA<sup>UTu</sup>), die durch ein zusätzliches Plasmid bereitgestellt werden, die Notwendigkeit für SelB und das SECIS-Element obsolet machen (Aldag *et al.*, 2013). Ein analoges System sollte auch den SelB-unabhängigen Einbau von Sec in *Aromatoleum aromaticum* erlauben, der bereits natürlicherweise SerRS und Seld enthält und nur noch ein *selA*-Gen und ein Gen für die modifizierte tRNA<sup>UTu</sup> benötigt. Dabei wird tRNA<sup>UTu</sup> von SerRS mit Serin beladen. Anschließend wandelt SelA den Seryl-Rest unter Bildung einer Schiff'schen Base, der Abspaltung von H<sub>2</sub>O und der Anlagerung von Selenid in einen Selenocysteyl-Rest um. Diese Sec-tRNA<sup>UTu</sup> wird direkt von Elongationsfaktor EF-Tu

erkannt und dem Ribosom zugeführt, sodass im resultierenden Protein ein Selenocystein zu finden sein sollte (Aldag *et al.*, 2013).

#### Herstellung von pASG3bssstrepCys489SecUGA und pASG3bssstrepCys489SecUAG

Zur Herstellung der Plasmide pASG3bssstrepCys489SecUGA und pASG3bssstrepCys489SecUAG wurde das Plasmid pASG3bssstrep+ori1 mit den Oligonukleotidpaaren P36/P37 (UGA) und P38/P39 (UAG, Tab. 20) amplifiziert. Anschließend wurde der jeweilige Matrizenstrang mithilfe von DpnI verdaut und der neusynthetisierte Strang ligiert. Die Ligationsansätze wurden über Elektroporation in *E. coli* DH5 $\alpha$  transferiert und darin propagiert. Aus mehreren Klonen wurden Plasmide isoliert und in einer Restriktionsanalyse durch NheI (UGA) und XbaI (UAG, Tab. 20) auf ihre Korrektheit überprüft. Als richtig identifizierte Kandidaten wurden im Anschluss durch Sequenzanalyse eindeutig verifiziert.

#### *Mutagenese des Argininrestes Arg508 zu Glutamin und Lysin*

Der Argininrest Arg508 ist an der Bindung des Fumarats beteiligt, indem es eine ionische Bindung mit der Carboxylgruppe des Fumarats aufbaut. Um dies zu überprüfen und eventuell in einem veränderten Enzym alternative Substrate wie 3-Acetylacrylsäure (Abb. 16) umzusetzen, wurde das entsprechende Codon CGA sowohl durch das von Glutamin (CAG) als auch das von Lysin (AAG) ersetzt. Zusätzlich wurde durch stumme Mutation eine BamHI-Schnittstelle (GGATCC) erzeugt (Tab. 20)

#### Herstellung von pASG3bssstrepArg508Lys und pASG3bssstrepArg508Gln

Zur Herstellung der Plasmide pASG3bssstrepArg508Lys und pASG3bssstrepArg508Gln wurde das Plasmid pASG3bssStrep+ori1 mit den Oligonukleotidpaaren P46/P47 (Lys) und P48/P49 (Gln) amplifiziert. Eine Restriktionsanalyse mit BamHI (Tab. 20) brachte auch hier Klone hervor, die das richtige Plasmid trugen.

#### *Mutagenese der Isoleucinreste Ile617 und 620 zu Valin und Glutamin*

Die beiden Isoleucinreste Ile617 und Ile620 sind in einigen anaeroben Toluol-abbauenden Stämmen entweder beide, wie bei *Azoarcus* sp. CIB und *Azoarcus* sp. T oder einzeln, wie bei *Geobacter metallireducens* durch Valin ersetzt (Abb. 21). Von den ersten beiden Stämmen ist

bekannt, dass sie unter anderem *m*-Xylol als Substrat für die BSS verwenden können (Dolfing *et al.*, 1990, Seyfried *et al.*, 1994, Verfürth, 2005). Um zu überprüfen, ob sich durch das Ersetzen dieser Isoleucinreste zu Valin oder Glutamin möglicherweise das Substratspektrum erweitert und die resultierende Variante beispielsweise *m*-Xylol umsetzen kann, wurden die beiden Codons der Isoleucinreste (ATC) durch jene von Valin (GTG/GTC) ersetzt (Tab. 20). Zusätzlich wurde das Codon des Isoleucinrests Ile620 allein zum Codon von Valin (GTC) bzw. Glutamin (CAA) umgewandelt und zur Identifikation jeweils eine EcoRI-Schnittstelle (GAATTC) erzeugt (Tab. 20).

Herstellung von pASG3bssstrepIle617+620Val, pASG3bssstrepIle620Val und pASG3bssstrepIle620Gln

Zur Herstellung der Plasmide pASG3bssstrepIle617+620Val, pASG3bssstrepIle620Val und pASG3bssstrepIle620Gln wurde das Plasmid pASG3bssstrep+ori1 mit den Oligonukleotidpaaren P43/P44 (617+6120Val), P42/P44 (620Val) und P42/P45 (620Gln) amplifiziert. Die Restriktionsanalyse mit EcoRI und MluI (nur Ile617+Ile620Val, Tab. 21) brachte mehrere Klone hervor, aus denen die korrekten Plasmide isoliert werden konnten.

**Tabelle 20:** Veränderung der ausgewählten Codons und der daraus resultierenden Aminosäure durch Basenaustauschmutation. Neben der Erzeugung veränderter Codons wurden zwecks einfacher Identifizierung der gesuchten Mutanten Restriktionsschnittstellen durch stille Basenmutation eingefügt. Die jeweiligen Codons, die erhalten werden, sind rot dargestellt, die eingefügte Schnittstelle ist unterstrichen. Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme: GCTAGC (NheI), TCTAGA (XbaI), GAATTC (EcoRI), ACGCGT (MluI), GGATCC (BamHI).

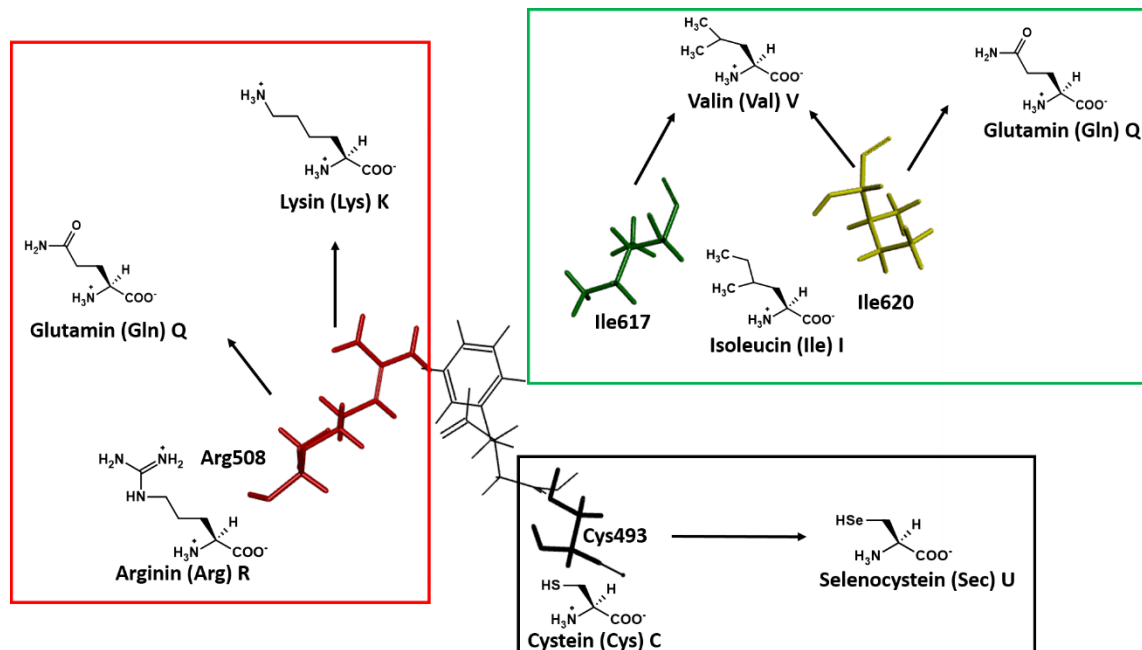
Oligo-nukleotide	Sequenzen (5'→3')	Verändertes Codon (mRNA)	erzeugte Schnittstelle
P36+P37	CAACGTGCTG <u>TGa</u> ATGGCGCCGGGGCTa <u>GCC</u> GGCCG CGGCCGG <u>Gc</u> tAGCCCCGGCGCCAT <u>tCA</u> CAGCACGTTG	UGC→UGA Cys493→Stopp	NheI
P38+P39	CAACGTGCTc <u>Tag</u> ATGGCGCCGG CCGGCGCCAT <u>ctAg</u> AGCACGTTG	UGC→UAG Cys493→Stopp	XbaI
P42+P44	GGTGATCGGGTTATGCCAGCCATTGGGCTGTTC TCC <u>gTC</u> GTCGCAGGgAA <u>tTC</u> GCTCGTC	AUC→GUC Ile620→Val	EcoRI
P42+P45	GGTGATCGGGTTATGCCAGCCATTGGGCTGTTC TCC <u>caa</u> GTCGCAGGgAA <u>tTC</u> GCTCGTCGCGATC	AUC→CAA Ile620→Gln	EcoRI

P43+P44	GGTcAcCGGGTTATGCCAGCCATTGGGCTGTTCCGACAACGCgtTC TCCgTCGTCGCAGGgAAtTCGCTCGTC	2x AUC→GUG+GUC Ile617+620→Val	MluI EcoRI
P46+P47	CAGAAGACCaaGTCCGAGGGCGGatcCGCGATC GATCGCGgatCCGCCCTCGGActtGGTCTTCTG	CGA→AAG Arg508→Lys	BamHI
P48+P49	CAGAAGACCcagTCCGAGGGCGGatcCGCGATC GATCGCGgatCCGCCCTCGGActGGTCTTCTG	CGA→CAG Arg508→Gln	BamHI

**Tabelle 21:** Aus *E. coli* DH5α isolierte Plasmide. Diese wurden mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen verdaut und so einer Vorauswahl unterzogen. Als richtig identifizierte Kandidaten wurden mittels Sequenzierung (s. Material und Methoden, Abschnitt 3.8) eindeutig verifiziert.

Plasmide	Restriktionsenzyme	Beschreibung/Erwartete Fragmente [Bp] <sup>a</sup>
pASG3bssStrep+ori1	BamHI	10040, 433
	EcoRI	7447, 3026
	MluI	wird nicht verdaut
	NheI	10473
	XbaI	10473
pASG3bssstrepCys489SecUGA	NheI	8995, 1478
pASG3bssstrepCys489SecUAG	XbaI	8717, 1756
pASG3bssstrepIle617+620Val	EcoRI	7447, 1529, 1497
	MluI	10473
pASG3bssstrepIle620Val	EcoRI	7447, 1529, 1497
pASG3bssstrepIle620Gln	EcoRI	7447, 1529, 1497
pASG3bssstrepArg508Lys	BamHI	8824, 1216, 433
pASG3bssstrepArg508Gln	BamHI	8824, 1216, 433

a: Bp = Basenpaare.



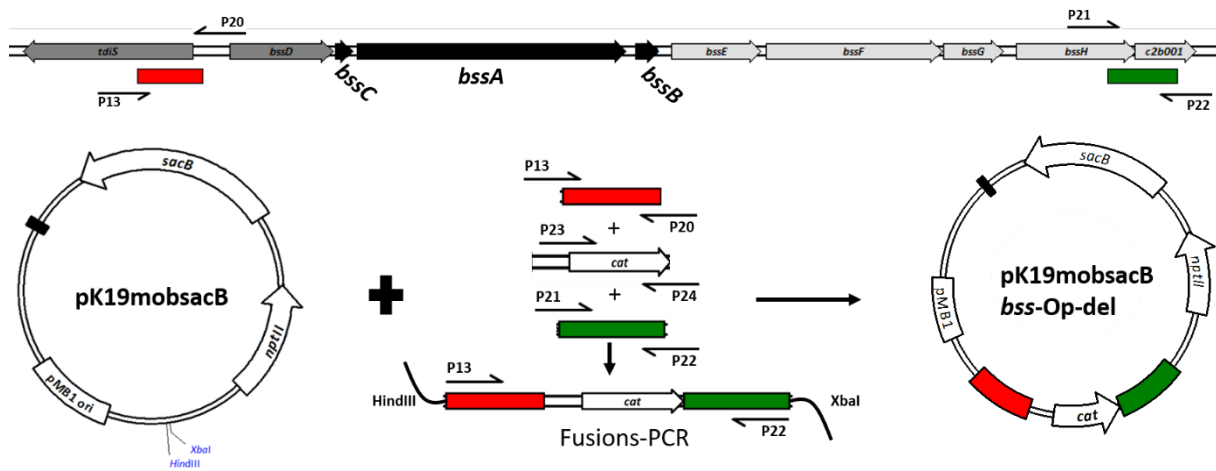
**Abbildung 21:** Die in dieser Arbeit veränderten Aminosäuren der BSS aus *Aromatoleum aromaticum* EbN1. Das für Arginin kodierende Codon CGA wurde zu AAG für Lysin oder CAG für Glutamin mutagenisiert. Die jeweils für Isoleucin kodierenden AUC-Codons der Reste Ile617 und Ile620 wurden zu den Codons GUG und GUC verändert, die jeweils für Valin kodieren. In zwei weiteren Mutanten wurde nur das für Ile620 kodierende AUC-Codon zu GUC (Valin) oder CAA (Glutamin) verändert. Schließlich wurde das für Cystein kodierende Codon UGC in zwei verschiedenen Mutanten zu den Stoppcodons UGA und UAG verändert. Durch Verwendung einer speziellen, artifiziiellen Hybrid-tRNA soll eine Inserierung von Selenocystein in das aktive Zentrum der BSS erfolgen.

Nachdem die Plasmide mit den veränderten Codons erfolgreich hergestellt und verifiziert werden konnten, wurde mehrfach versucht, diese mittels Konjugation in *A. aromaticum* EbN1-SR7 zu transferieren. Obwohl eine Vielzahl von Bedingungen getestet wurde, war es im Rahmen dieser Arbeit bislang nicht möglich, entsprechende Klone, die das veränderte Plasmid erhalten, zu generieren. Zwar konnten einige Kolonien auf Festmedium isoliert und vereinzelt werden, jedoch blieb die Kultivierung dieser Klone in Flüssigmedium erfolglos.

## 5. Vollständige und partielle Deletion des *bss*-Operons in *Aromatoleum aromaticum* EbN1-SR7

Die Strukturgene der BSS, *bssC*, *A*, und *B* sind zusammen mit dem Gen für das Aktivierungsenzym BssD und weiteren Genen unbekannter Funktion *bssE*, *F*, *G* und *H* in einem Operon organisiert. Die Transkription dieses Operons wird durch das Zweikomponenten-System TdiS, einem Sensor und TdiR, einem Regulatorprotein, gesteuert. Für diese Arbeit sollte das *bss*-Operon ganz oder partiell deletiert werden.

In einer Mutante sollten die Gene *bssD* - *bssH*, in einer zweiten die Gene *bssD*-*bssB* und in einer dritten die Gene *bssE* - *bssH* deletiert werden. Dazu wurden stromaufwärts und stromabwärts des zu deletierenden Bereiches Abschnitte von ca. 750 Basenpaaren mittels PCR amplifiziert (Abb. 22). Zwischen diese im Folgenden als *up*- und *down*-Fragmente bezeichneten Bereiche wurde mittels Fusions-PCR das *cat*-Gen für eine Chloramphenicol-Acetyltransferase eingefügt (Abb. 22), welches aus dem Plasmid pASK6 amplifiziert wurde (Abb. 22). Die so erhaltenen Fragmente aus *up*-Region, *cat*-Kassette und *down*-Region wurden in das Plasmid pK19mobsacB kloniert und das resultierende Konstrukt in *E. coli* DH5 $\alpha$  propagiert. Im Anschluss daran wurden die Plasmide zwecks nachfolgender Konjugation in *E. coli* S17-1 transferiert. Die Konjugation wurde wie in Material und Methoden (Abschnitt 2.8.5) beschrieben durchgeführt. Der ausgeübte Selektionsdruck durch Kanamycin führte anschließend dazu, dass *A. aromaticum* EbN1-SR7 das jeweilige Plasmid stromaufwärts oder stromabwärts des zu deletierenden Bereiches einbaut (Abb. 24, I bzw. II).



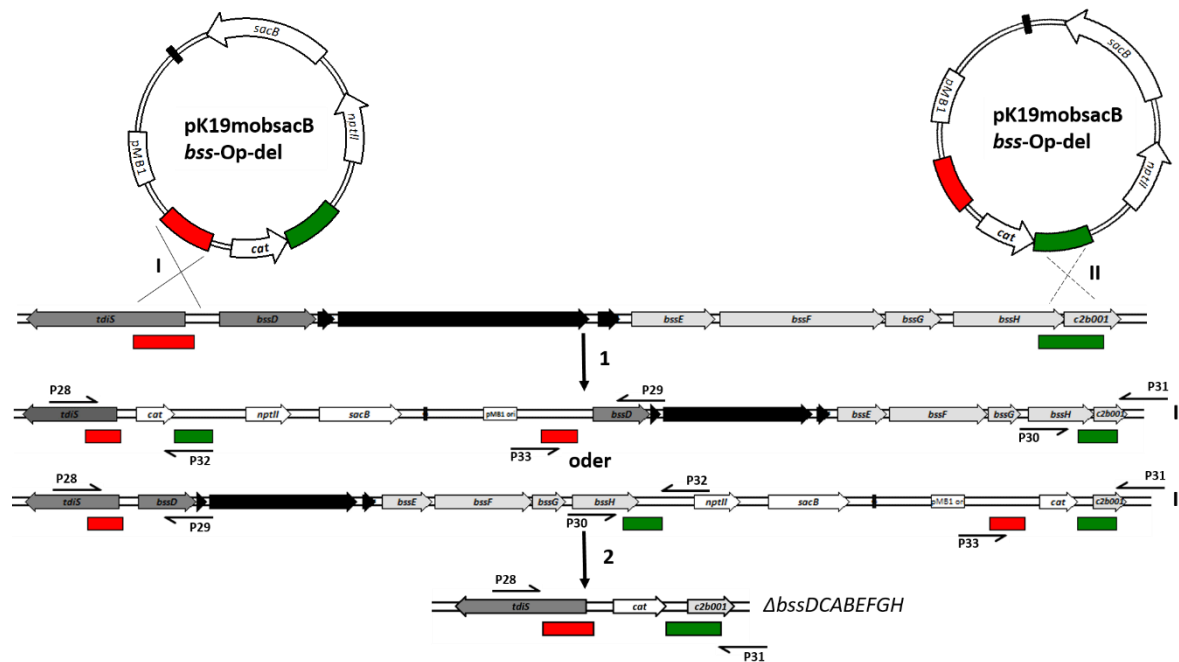
**Abbildung 22:** Herstellung des Plasmids pK19mobsacB bss-Op-del (rechts) aus pK19mobsacB (links) und eines durch Fusions-PCR aus *up-Fragment* (rot), *down-Fragment* (grün) und *cat*-Gen hergestellten Inserts (Mitte). Die einzelnen Fragmente wurden durch Amplifikation einer stromaufwärts (rot) und stromabwärts (grün) vom *bss*-Operon liegenden Region aus dem Genom von *A. aromaticum* EbN1 mithilfe der Oligonukleotidpaare P13/P20 und P21/P22 hergestellt. Das *cat*-Gen für eine Chloramphenicol-Resistenz wurde mit den Oligonukleotiden P23 und P24 aus dem Plasmid pASK6C amplifiziert. Durch die revers komplementären Oligonukleotide P20/P23 und P24/P21 wurden überlappende Sequenzen hergestellt. Durch eine anschließende Fusions-PCR mithilfe der außenliegenden Oligonukleotide P13 und P22 wurden die Fragmente miteinander verbunden. Die Gene *nptII* und *cat* verleihen dem Träger eine Resistenz gegenüber Kanamycin bzw. Chloramphenicol, indem sie für eine Neomycin-Phosphotransferase bzw. Chloramphenicol-Acetyltransferase kodieren. Das *sacB*-Gen verleiht dem Stamm eine Sensitivität gegenüber Saccharose durch Kodierung einer Levansucrase. Zusätzlich enthalten die Plasmide die *origins of replication* RP4 (schwarzer Balken) und pMB1. Der Vektor und das Insert wurden durch die Restriktionsendonucleasen HindIII und XbaI geschnitten und anschließend in einer T4-Ligase-abhängigen Reaktion ligiert.

### Herstellung von pK19mobsacBOpdel

Zur Herstellung von pK19mobsacBOpdel wurde mit den Oligonukleotiden P23 und P24 die Chloramphenicol-Resistenzkassette (das *cat*-Gen) von dem Plasmid pASK6C amplifiziert (Abb. 22). Dieses wurde anschließend mittels Fusions-PCR mit den flankierenden Bereichen (für den stromaufwärts-liegenden Teil Oligonukleotide P13 und P20, stromabwärts liegend P21 und P22) des *bss*-Operons fusioniert, wobei die Oligonukleotide P13 und P22 verwendet wurden (Abb. 22).

### Herstellung von pK19mobsacBDBdel

Das Plasmid pK19mobsacBDBdel wurde analog zu pK19mobsacBOpdel hergestellt. Zur Amplifikation der *cat*-Resistenzkassette wurden die Oligonukleotide P17 und P19 verwendet. Die Stromaufwärts-Region wurde mit P13 und P14, die Stromabwärts-Region mit P16 und P6 amplifiziert. Die einzelnen Fragmente wurden mit den Oligonukleotiden P13 und P6 fusioniert.



**Abbildung 23:** Stromaufwärts- (I) und stromabwärts- (II) Integration des Plasmids pK19mobsacB<sub>bss-Op-del</sub> ins Genom von *A. aromaticum* EbN1-SR7 (1) mit anschließender Deletion (2) des zu deletierenden Bereichs zur Erhaltung der gesuchten Mutante. Die Stromaufwärts-Integration wurde mit den Oligonukleotidpaaren P28/P32, P33/P29 und P30/P31 verifiziert, für die Stromabwärts-Integration wurden P28/P29, P30/P32 und P33/P31 verwendet. Die Verifizierung der Deletionsmutante  $\Delta bssDCABEFGH$  erfolgte mit dem Oligonukleotidpaar P28/P31.

### Herstellung von pK19mobsacBEHdel

Das Plasmid pK19mobsacBEHdel wurde analog zu pK19mobsacBOpdel hergestellt. Zur Amplifikation der *cat*-Resistenzkassette wurden die Oligonukleotide P27 und P18 verwendet. Die Stromaufwärts-Region wurde mit P26 und P27, die stromabwärts-Region mit P15 und P8 amplifiziert. Die einzelnen Fragmente wurden mit den Oligonukleotiden P25 und P8 fusioniert.

Die hergestellten Fusionskonstrukte für die verschiedenen Deletionsansätze wurden mithilfe der T4-Ligase separat in das Plasmid pK19mobsacB ligiert, die Konstrukte mittels



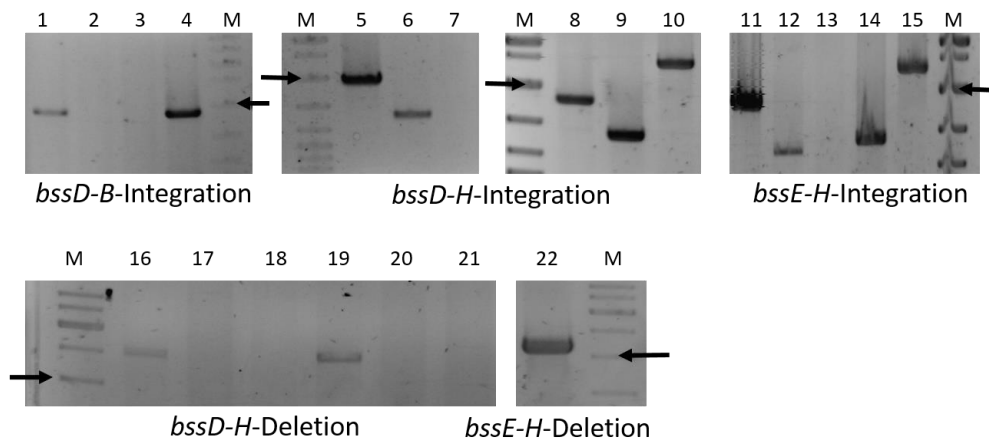
Elektroporation in *E. coli* DH5 $\alpha$  transferiert und schließlich zur Analyse verschiedenen Restriktionsverdauereaktionen mit HindIII und XbaI (Operondeletion und *bssD-B*-Deletion) bzw. EcoRI und KpnI (*bssE-H*-Deletion) unterzogen (Tab. 22).

**Tabelle 22:** Aus *E. coli* DH5 $\alpha$  isolierte Plasmide. Diese wurden mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen verdaut und so einer Vorauswahl unterzogen. Als richtig identifizierte Kandidaten wurden im Anschluss durch Sequenzierung (s. Material und Methoden, 3.8) eindeutig verifiziert.

Plasmide	Restriktionsenzyme	Beschreibung/Erwartete Fragmente [Bp] <sup>a</sup>
pK19mobsacB	EcoRI	5720
	KpnI	2882, 2450, 388
	PvuI	5720
pK19mobsacBOpdel	KpnI	4667, 2882, 388
	PvuI	5869, 436, 339, 293
pK19mobsacBDBdel	KpnI	4608, 2882, 388
	PvuI	5869, 2009
pK19mobsacBEHdel	EcoRI	5853, 1985
	KpnI	4568, 2882, 388

a: Bp = Basenpaare.

Die Integration der Plasmide pK19mobsacBOpdel, pK19mobsacBDBdel und pK19mobsacBEHdel wurde mithilfe von PCR überprüft. Dabei wurden die in Abbildung 23 dargestellten Oligonukleotidpaare P28/P32, P33/P29, P30/P31, P28/P29, P30/P32 und P33/P31 verwendet, um eine stromaufwärts oder stromabwärts erfolgte Integration nachzuweisen (Abb. 23 Schritt 1, I und II). Interessanterweise zeigen die untersuchten Klone sowohl Hinweise für eine stromaufwärts gerichtete als auch für eine stromabwärts gerichtete Integration (Abb. 24 und Tab. 23 im Anhang). Trotz weiterer Isolierung der untersuchten Mutante und wiederholten PCR-Reaktionen war diese Beobachtung reproduzierbar. Die identifizierten Integrationsmutanten mit merodiploidem Genotyp wurden anschließend ohne Selektionsdruck in zwei Passagen kultiviert. Anschließend erfolgte durch Ausplattieren auf Saccharose-haltigem Medium die Negativselektion. Da das auf den Plasmiden vorhandene *sacB*-Gen, welches für eine Levansucrase kodiert, dem Stamm eine Sensitivität gegenüber Saccharose verleiht, erfolgt ein zweites Rekombinationsereignis, bei dem das Plasmid aus dem Genom entfernt wird (Abb. 23, Schritt 2). Die erwünschten Mutanten werden erhalten, sofern das zweite Rekombinationsereignis auf der anderen Seite verläuft, als das erste. Finden beide Rekombinationsereignisse auf der gleichen Seite statt, wird der Wildtyp erhalten.



**Abbildung 24:** Nachweis der Integration der Plasmide pK19mobsacB-Opdel, -DBdel und -EHdel ins Genom von *A. aromaticum* EbN1-SR7 (oben) und der anschließenden Deletion des Genombereichs (unten). **M:** Der Pfeil deutet auf das 2 kB-Fragment des Größenstandards Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific). **1 – 4:** Integration des Plasmids pK19mobsacB-DBdel und Kontrolle durch die Oligonukleotidpaare P28/P29 (1), P30/P31 (2), P28/P32 (3), P29/P33 (4). Spur 1 weist mit dem Signal bei ca. 2 kB auf die stromabwärts gerichtete Integration hin (1915 Bp.), Spur 4 zeigt für den gleichen Klon ein Signal bei ca. 1,8 kB, welches für eine stromaufwärts gerichtete Integration erwartet wird (1848 Bp.). **5 – 10:** Integration des Plasmids pK19mobsacB-Opdel und Kontrolle durch die Oligonukleotidpaare P28/P29 (5), P30/P31 (6), P28/P32 (7), P29/P33 (8), P30/P32 (9) und P31/P33 (10). Spur 5 weist mit dem Signal bei ca. 2 kB auf die stromabwärts gerichtete Integration hin (1915 Bp.), Spur 6 zeigt für den gleichen Klon ein Signal bei ca. 1,4 kB, welches für eine stromaufwärts gerichtete Integration erwartet wird (1367 Bp.). **11 – 15:** Integration des Plasmids pK19mobsacB-EHdel und Kontrolle durch die Oligonukleotidpaare P28/P29 (11), P30/P31 (12), P28/P32 (13), P30/P32 (14) und P31/P33 (15). Spur 11 weist mit dem Signal bei ca. 2 kB auf die stromabwärts gerichtete Integration hin (1915 Bp.), Spuren 12, 14 und 15 zeigen für den gleichen Klon Signale bei ca. 1,4 kB, 1,5 kB und 5,8 kB, welche für eine stromaufwärts gerichtete Integration erwartet werden (1367 Bp., 1452 Bp. und 5806 Bp.). **16 – 21:** Überprüfung sechs potentieller Deletionsmutanten mit dem Genotyp  $\Delta bssDCABEFGH$  durch das zweite Rekombinationsereignis mit der Entfernung des Plasmids pK19mobsacB-Opdel unter Verwendung der Oligonukleotidpaare P28+P31. Spuren 16 und 19 zeigen das für eine erfolgreiche Deletion zu erwartende Signal bei ca. 2,5 kB (2574 Bp) **22:** Nachweis einer Deletionsmutante mit dem Genotyp  $\Delta bssEFGH$  durch das zweite Rekombinationsereignis mit der Entfernung des Plasmids pK19mobsacB-EHdel unter Verwendung des Oligonukleotidpaares P25+P8. Die Spur zeigt das bei erfolgreicher Deletion zu erwartende Signal von 2160 Bp.

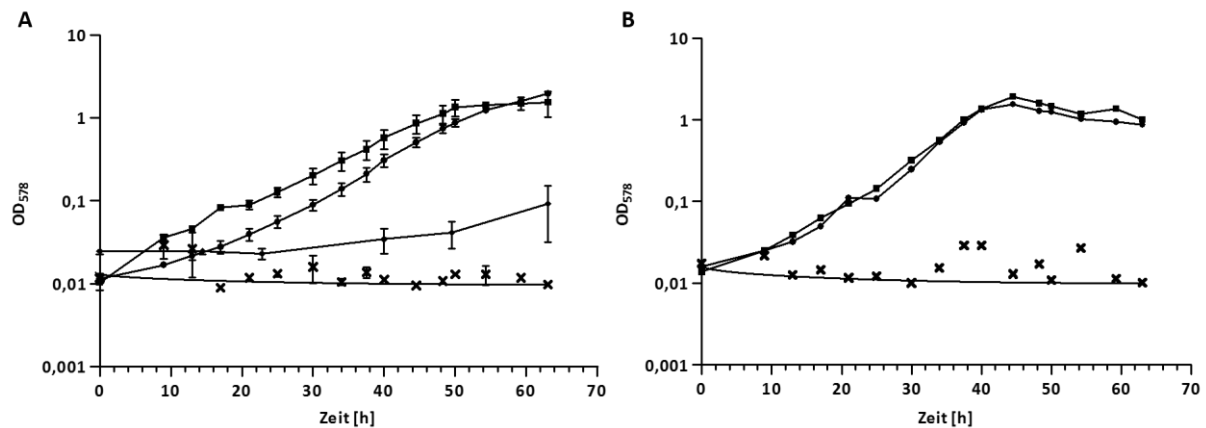
Die nach dem Ausplattieren auf Saccharose erhaltenen Klone wurden mithilfe von PCR unter Verwendung der Oligonukleotidpaare P28/P32 (Operon-Deletion), P13/P6 ( $\Delta bssDCAB$ ) und P25/P8 ( $\Delta bssEFGH$ ) auf die gewünschte Deletion des jeweiligen Genomabschnittes untersucht. Für die Deletion des ganzen Operons und für den hinteren Abschnitt des Operons (*bssEFGH*) konnten erfolgreich Mutanten identifiziert werden (Abb. 24). Eine Mutante, bei der

der vordere Abschnitt des Operons (*bssDCAB*) deletiert werden sollte, konnte nicht identifiziert werden. Die Mutanten  $\Delta bssD-H$  und  $\Delta bssE-H$  zeigten wie erwartet eine Sensitivität gegenüber Kanamycin bei immer noch vorhandener Resistenz gegenüber Chloramphenicol im Medium. Eine Sequenzierung des betroffenen Genomabschnittes nach Sanger bestätigte die Deletion zusätzlich (Daten nicht gezeigt).

## 6. Phänotypische Charakterisierung der Mutanten $\Delta bssDCABEFGH$ und $\Delta bssEFGH$

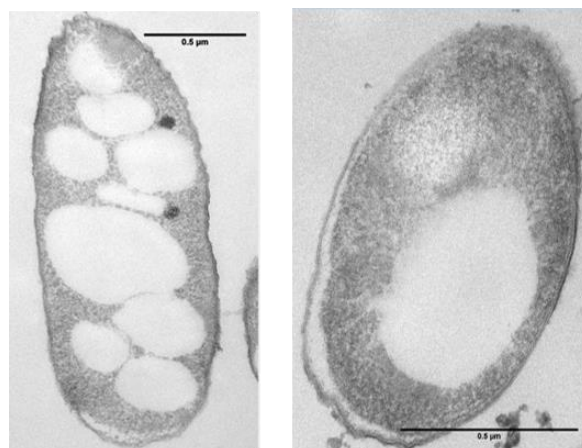
Die Deletion der Gene *bssDCABEFGH* bzw. *bssEFGH* konnte durch PCR und Sequenzierung gezeigt werden. Um zu überprüfen, ob dadurch Wachstum auf Toluol ausbleibt, wurden von den in dieser Arbeit erstellten Stämme unter Kultivierung auf Toluol als Wachstumssubstrat Wachstumskurven aufgenommen. Das Ergebnis des Experiments ist in Abbildung 25 dargestellt.

Unerwarteterweise konnten beide Mutanten mit Toluol als einzige zugegebene Kohlenstoffquelle und ohne Adaption auf das Substrat wachsen und zwar mit einer Wachstumsrate von  $0,102\text{ h}^{-1}$  für  $\Delta bssDCABEFGH$  und  $0,124\text{ h}^{-1}$  für  $\Delta bssEFGH$  und einer Verdopplungszeit von 6,83 h für  $\Delta bssDCABEFGH$  und 5,6 h für  $\Delta bssEFGH$ , die für Wachstum mit Toluol als Substrat untypisch ist (Abb. 25, links). Gleichzeitig wuchs ein nicht auf Toluol adaptierter Wildtyp EbN1-SR7 in den 65 Stunden Inkubation überhaupt nicht, während bei einem auf Toluol adaptierten Stamm *A. aromaticum* EbN1 erst nach ca. 50 h die erste Trübung des Mediums zu beobachten war (Abb. 25, links). Erstaunlicherweise wuchsen die beiden Mutanten auch, wenn weder Toluol noch eine andere Kohlenstoffquelle dem Medium hinzugegeben wurde (Abb. 25, rechts). Dabei erreichten sie bei einer Wachstumsrate von  $0,15\text{ h}^{-1}$  ( $\Delta bssDCABEFGH$ ) und  $0,16\text{ h}^{-1}$  ( $\Delta bssEFGH$ ) und Verdopplungszeiten von 4,64 bzw. 4,14 Stunden die stationäre Phase bereits nach 40 Stunden Inkubationszeit bei einer  $OD_{578}$  von über 1. Der Wildtyp EbN1-SR7 wurde ebenfalls in Medium ohne externe Kohlenstoffquelle überführt, zeigte jedoch auch nach über 60 Stunden kein Anzeichen von Wachstum (Abb. 25, rechts).



**Abbildung 25:** Wachstum von *ΔbssDCABEFGH* (■), *ΔbssEFGH* (●), EbN1-SR7 (x) und EbN1 auf Toluol (◆) (A) und ohne Kohlenstoffquelle (B).

Eine mögliche Ursache dieses interessanten Phänomens könnte die Einlagerung von großen Mengen Polyhydroxybuttersäure (PHB) während des Wachstums mit Benzoat als Kohlenstoffquelle sein (Trautwein *et al.*, 2008). PHB ist unter dem Elektronenmikroskop als weißer vakuolenartiger Einschluss sichtbar (Abb. 26) und könnte den Mutanten als Kohlenstoffquelle dienen, sofern kein anderes Wachstumssubstrat außer des Elektronenakzeptors Nitrat vorhanden ist. Um eine Kontamination der Kultur mit beispielsweise auf Toluol adaptierten *T. aromatica* K172, der ebenfalls in dieser Arbeit verwendet wurde, auszuschließen, wurde eine 16S-rRNA-Gensequenzierung durchgeführt und die Identität der Mutanten als *A. aromaticum* EbN1-Derivate eindeutig verifiziert.



**Abbildung 26:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *T. aromatica* K172, auf Toluol inkubiert (links), und *A. aromaticum* EbN1, auf Benzoat kultiviert (rechts). Der angezeigte Maßstab entspricht 0,5 µm (in Kooperation mit E. Muhr).

## 7. Aufklärung der Stereochemie der enzymatischen Umsetzung von Benzylsuccinat mit chiralem Toluol

Die Benzylsuccinat-Synthase wandelt Toluol und Fumarat spezifisch zu (*R*)-Benzylsuccinat um. Bislang war jedoch unklar, ob die Abstrahierung des Wasserstoffatoms von der Methylgruppe des Toluols mit anschließender Addition an die Doppelbindung des Fumarats mit einer Retention oder Inversion der Konfiguration stattfindet. Um dies zu überprüfen, wurden die Enantiomere (*R*)- und (*S*)-Toluol, die eine chirale Methylgruppe besitzen, von Dr. Peter Friedrich hergestellt (Material und Methoden, Abb. 11). Die beiden Stereoisomere wurde mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem Fumarat zu Benzylsuccinat umgesetzt. Das [ $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ]-Benzylsuccinat wurde im Anschluss in zwei enzymatischen Schritten mithilfe der Benzylsuccinat-CoA-Transferase BbsEF und der Benzylsuccinyl-CoA-Dehydrogenase BbsG mit einer Ausbeute von über 90 % zu Phenylitaconyl-CoA umgesetzt (Daten nicht gezeigt), während mit einer chemischen Umsetzung des Benzylsuccinats nach Schachter und Taggart (1953) nur 35 % Ausbeute erzielt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Ausgehend von der Erhaltung oder des Verlusts an Tritiummarkierung in der Probe kann auf die Stereochemie des Benzylsuccinats geschlossen werden (Abb. 28 und Abb. 29).

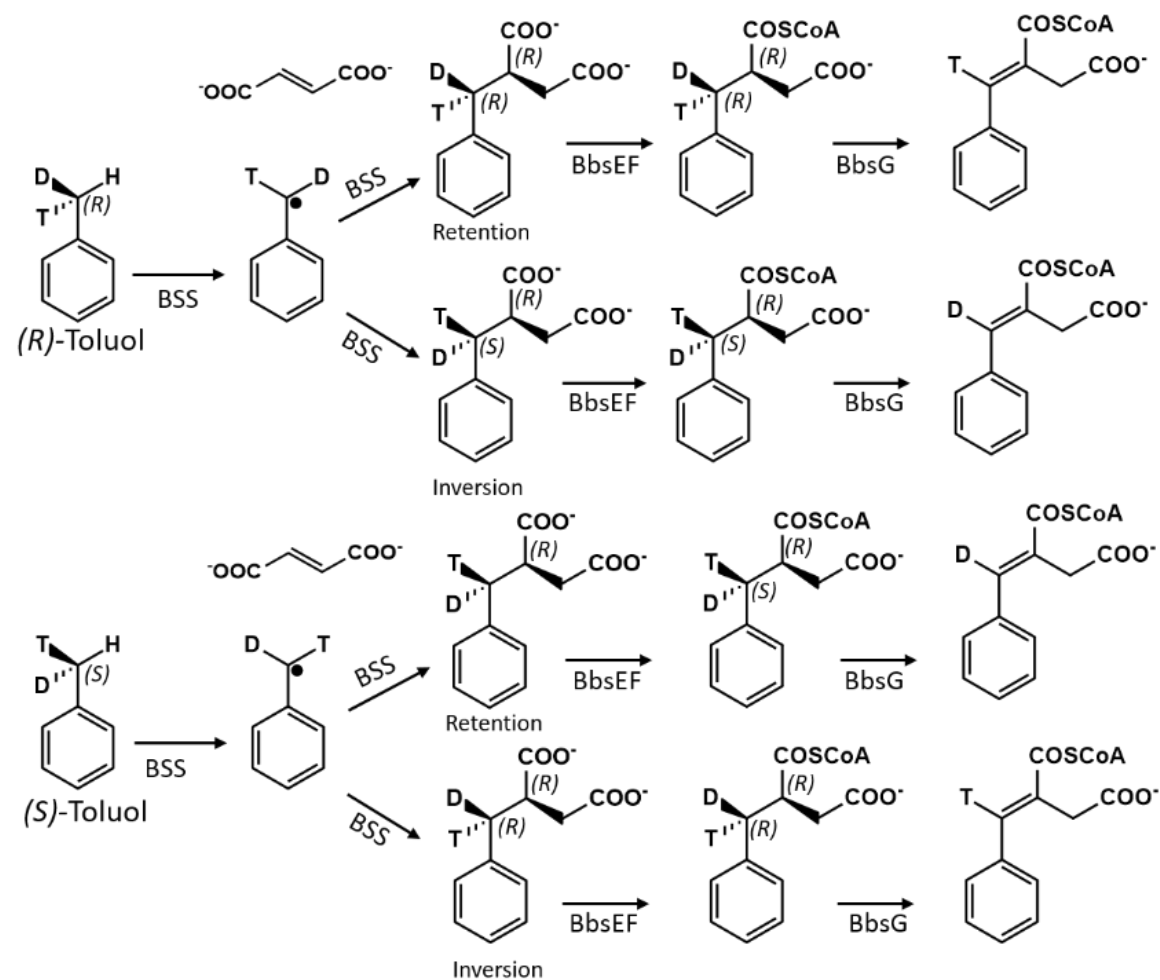
Die von Li und Marsh (2006) ermittelten kinetischen Isotopeneffekte zwischen  $^1\text{H}$  und  $^2\text{H}$  von 2,9 – 3,1 bezogen sich auf ein BSS-Isoenzym von *Thauera aromatica* T1. In seiner Dissertation ermittelte Markus Hilberg (2012) für die Benzylsuccinat-Synthase aus *T. aromatica* K172, den in dieser Arbeit verwendeten Stamm, für deuteriertes [ $^2\text{H}_8$ ]-Toluol eine spezifische Aktivität der Benzylsuccinat-Synthase von  $4 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  Protein im Vergleich zu nicht deuteriertem Toluol mit  $16 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  Protein, sodass in dieser Arbeit zwischen  $^1\text{H}$  und  $^2\text{H}$  von einem kinetischen Isotopeneffekt von 4 ausgegangen wird. Nach der Swain-Schaad-Gleichung (Abb. 27) kann demnach zwischen  $^1\text{H}$  und  $^3\text{H}$  von einem Isotopeneffekt von 7,4 ausgegangen werden (Klinman, 1991).

$$\frac{k_H}{k_T} = \left( \frac{k_H}{k_D} \right)^{1,442}$$

**Abbildung 27:** Swain-Schaad-Gleichung.  $k_H$ ,  $k_D$ ,  $k_T$ : Umsatzraten für protoniertes, deuteriertes und Tritiummarkiertes Toluol. Setzt man für  $k_H/k_D$  4,0 in die Gleichung ein, erhält man für  $k_H/k_D$  einen Isotopeneffekt von 7,38.

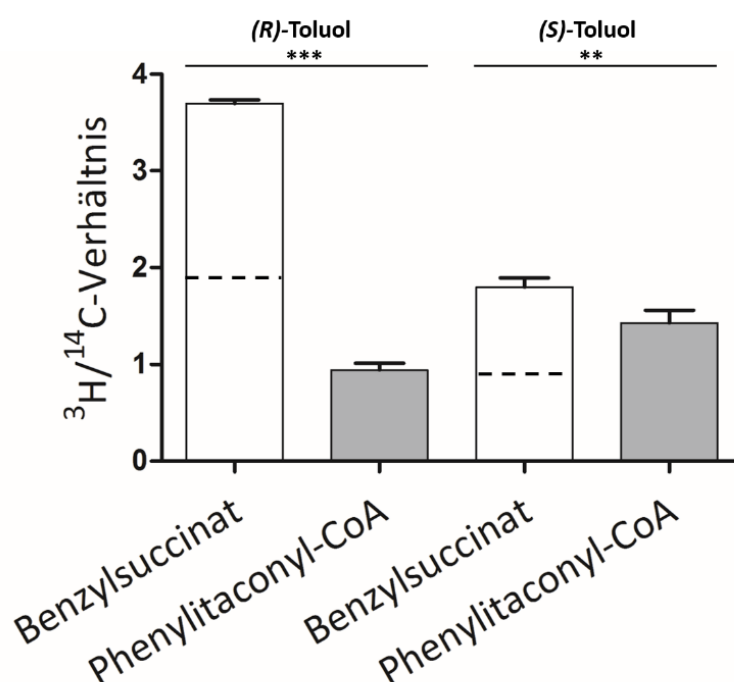
Durch diese vergleichsweise hohen, intermolekularen kinetischen Isotopeneffekte sollten signifikante Unterschiede zwischen den beiden Enantiomeren (*R*)-Toluol und (*S*)-Toluol erkennbar werden. Die Werte für die intramolekularen kinetischen Isotopeneffekte der beiden Toluolenantiomere, die eigentlich herangezogen werden sollten und geringfügig von denen der intermolekularen Isotopeneffekte abweichen (Lenz & Eggerer, 1976), sind nicht verfügbar.

Aufgrund des signifikanten kinetischen Isotopeneffekts wird bei der Verwendung von chiralem Toluol, welches mit drei unterschiedlich schweren Wasserstoffatomen an der Methylgruppe versehen ist ( $^1\text{H} < ^2\text{H} (\text{D}) < ^3\text{H} (\text{T})$ , Abb. 29) erwartungsgemäß bevorzugt das leichteste der drei,  $^1\text{H}$ , von der Benzylsuccinat-Synthase abstrahiert, sodass ein  $[1\text{-}^3\text{H}, 1\text{-}^2\text{H}]$ -Benzylradikal entsteht (Abb. 28). Dieses Benzylradikal wird daraufhin mit  $[^{14}\text{C}_4]$ -Fumarat durch die Benzylsuccinat-Synthase zu  $[^{14}\text{C}, 1\text{-}^3\text{H}, 1\text{-}^2\text{H}]$ -Benzylsuccinat umgesetzt, welches an der Methylengruppe Deuterium- bzw. Tritium-markiert ist (Abb. 28). Bei der Umsetzung des Benzylsuccinats zu Phenylitaconyl-CoA bleibt je nach eingesetztem Ausgangs-Enantiomer die Tritium-Markierung erhalten oder geht verloren (Abb. 28). Gleichzeitig bleibt die  $^{14}\text{C}$ -Markierung vollständig erhalten, sodass jegliche Verringerung des  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnisses auf den Verlust der Tritium-Markierung zurückzuführen ist. Durch Vergleich des  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnisses im Benzylsuccinat und im Phenylitaconat kann so auf die stereochemische Konfiguration rückgeschlossen werden (Abb. 28 und 29).



	<i>Retention</i>	<i>Inversion</i>
<i>R</i> -Toluol	$^3\text{H}$ -Markierung bleibt erhalten	$^3\text{H}$ -Markierung geht verloren
<i>S</i> -Toluol	$^3\text{H}$ -Markierung geht verloren	$^3\text{H}$ -Markierung bleibt erhalten

**Abbildung 28:** Mögliche Produkte der Benzylsuccinat-Synthase (BSS) aus chiraalem (*R*)- und (*S*)-Toluol durch Retention oder Inversion und weitere enzymatische Umsetzung durch die Benzylsuccinat-CoA-Transferase (BbsEF) und die Benzylsuccinyl-CoA-Dehydrogenase (BbsG) zu Phenylitaconyl-CoA.



**Abbildung 29:** Ermittelte  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnisse von Benzylsuccinat und Phenylitaconyl-CoA, entstanden aus (*R*)- oder (*S*)-Toluol. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten jeweils durchgeführt mit drei Messungen. Die gemittelten Retentionswerte der Tritiummarkierung in Phenylitaconyl-CoA sind 32 % für (*R*)- und 75 % für (*S*)-Toluol. Ein gepaarter t-Test zeigte für die Paare Benzylsuccinat/Phenylitaconyl-CoA aus beiden Toluolenantiomeren signifikante Unterschiede (\*\*  $\triangleq p$ -Wert  $\leq 0,01$ , \*\*\*  $\triangleq p$ -Wert  $< 0,001$ ). Die gestrichelte Linie zeigt die erwarteten Messwerte im entsprechenden Produkt in einer nicht-stereoselektiven Reaktion oder mit einem Razemat aus (*R*)- und (*S*)-Toluol. Die gesamte Radioaktivität in den untersuchten Benzylsuccinatproben variierte von 12 – 18 Bq  $^3\text{H}$  und 2 – 5 Bq  $^{14}\text{C}$  mit Proben aus (*R*)-Toluol und zwischen 13-21 Bq  $^3\text{H}$  und 2- 12 Bq  $^{14}\text{C}$  mit Proben aus (*S*)-Toluol.

Bei Verwendung von (*R*)-Toluol wurde festgestellt, dass bei der Umsetzung des damit gebildeten Benzylsuccinats zu Phenylitaconyl-CoA 79 % der  $^3\text{H}$ -Markierung verloren ging. Verwendete man dagegen (*S*)-Toluol, blieben 77 % der  $^3\text{H}$ -Markierung erhalten (Abb. 29). Da die Benzylsuccinyl-CoA-Dehydrogenase die Wasserstoffatome in *anti*-Orientierung eliminiert, zeigen die Beobachtungen dieses Experiments an, dass mit der Bildung des Benzylsuccinats eine Inversion des chiralen Zentrums der Methylgruppe des Toluols einhergeht (Abb. 28). Aufgrund der kinetischen Isotopeneffekte (4,0 für  $^1\text{H}/^2\text{H}$  und 7,4 für  $^1\text{H}/^3\text{H}$ , Abb. 27) ist zu erwarten, dass zunächst von den chiralen Toluolen zu 72 % das Wasserstoffatom, zu 18 % das Deuteriumatom und zu 10 % das Tritiumatom abstrahiert wird. Jedes abstrahierte



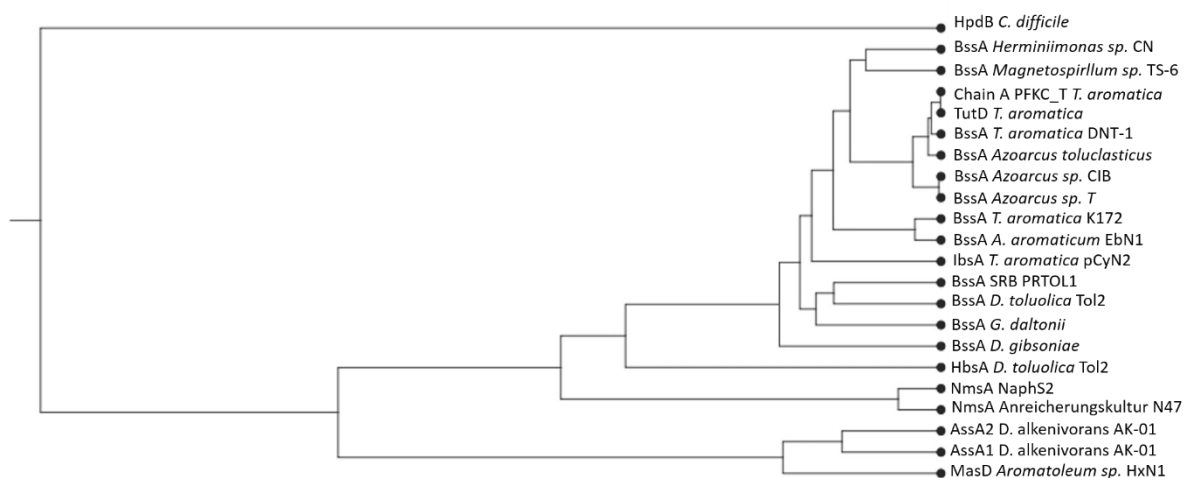
Tritiumatom landet jedoch wie in Abbildung 3 (Einleitung) erkennbar wieder am Benzylsuccinat und wird im Anschluss nicht wieder durch die Benzylsuccinyl-CoA-Dehydrogenase abstrahiert. Somit sollten im Falle einer Inversion der Konfiguration der Methylgruppe beim Einsatz von (*S*)-Toluol 82 % der  $^3\text{H}$ -Markierung und im Falle von (*R*)-Toluol 28 % der  $^3\text{H}$ -Markierung beibehalten werden. Diese Erwartung steht im Einklang mit den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen. Bestätigt werden diese Ergebnisse zudem durch die kürzlich aufgeklärte Röntgenstruktur des Enzyms mit beiden Substraten (Funk *et al.*, 2014) und durch quantenmechanische Modelling-Experimente von Maciej Szaleniec (Szaleniec & Heider, 2016). Es ist somit erstmals experimentell gezeigt worden, dass der Mechanismus der BSS, wie auch der der Methylpentylsuccinat-Synthase aus dem Alkanabbau nach einer Inversion verläuft (Jarling *et al.*, 2012).

## VII. Diskussion

### 1. Taxonomische Einordnung anaerober Toluolabbauer

Anaerobe Toluolabbauer gehören zu keiner phylogenetischen Gruppe und können nach ihrem jeweiligen Stoffwechseltyp in denitrifizierende (Rabus & Widdel, 1995), Eisen-(III)-reduzierende (Lovley & Lonergan, 1990), Sulfat-reduzierende (Beller *et al.*, 1996), Protonen-reduzierende und phototrophe Spezies (Zengler *et al.*, 1999) unterteilt werden. Alle diese Arten enthalten in ihrem Genom ein Operon mit den Genen der Benzylsuccinat-Synthase.

Die meisten der bekannten Toluol-abbauenden denitrifizierenden Bakterien gehören zu den Gattungen *Thauera*, *Azoarcus*, *Georgfuchsia* und *Aromatoleum* innerhalb der  $\beta$ -proteobakteriellen Familie *Rhodocyclaceae* (Anders *et al.*, 1995, Rabus & Widdel, 1995, Weelink *et al.*, 2009). Andere nicht näher verwandte denitrifizierende Stämme, die zu den Gattungen *Magnetospirillum* ( $\alpha$ -Proteobakterien) und *Herminiimonas* ( $\beta$ -Proteobakterien) gehören, haben diese Fähigkeit wahrscheinlich durch lateralen Gentransfer aus Mitgliedern der ersten Gruppe erworben (Abb. 30).



**Abbildung 30:** Phylogenetischer Stammbaum der katalytischen Untereinheiten von BSS und anderen Fumarat-addierenden Enzymen. Das multiple Alignment und die Erstellung des Stammbaums erfolgte mit der Software CLC Genomics Workbench 8 (Qiagen) nach der Methode UPGMA (*unweighted pair group with arithmetic mean*). Die Verwandtschaftsentfernung auf Proteinebene wurde in der genannten Software nach der Methode „Jukes Cantor“ ermittelt. HpdB: 4-Hydroxyphenylacetat-Decarboxylase, BssA, TutD und Chain A PFKC\_T: Benzylsuccinat-Synthase, lbsA: Isopropyl-Benzylsuccinat-Synthase, HbsA: Hydroxybenzylsuccinat-Synthase, NmsA: 2-Naphtylmethylsuccinat-Synthase, AssA1/AssA2 und MasD: 1-Methylalkylsuccinat-Synthase. SRB: Sulfat-reduzierendes Bakterium.

Metallionenreduzierende Spezies, die entweder  $\text{Fe}^{\text{III}}$  zu  $\text{Fe}^{\text{II}}$ ,  $\text{Mn}^{\text{IV}}$  zu  $\text{Mn}^{\text{II}}$  oder  $\text{U}^{\text{VI}}$  zu  $\text{U}^{\text{IV}}$  reduzieren, gehören größtenteils zu den strikt anaeroben Gattungen *Geobacter* oder *Georgfuchsia* ( $\delta$ -Proteobakterien bzw.  $\beta$ -Proteobakterien).

Toluolabbauende Sulfatreduzierer sind innerhalb der  $\delta$ -Proteobakterien meist den Gattungen *Desulfobacula*, *Desulfobulbus* oder *Desulfosarcina* (Abu Laban *et al.*, 2015, Harms *et al.*, 1999b, Harms *et al.*, 1999a, Kleindienst *et al.*, 2014, Rabus *et al.*, 1993, Wöhlbrand *et al.*, 2013), innerhalb der Firmicutes den Gattungen *Desulfotomaculum* oder *Desulfosporosinus* zuzuordnen (Morasch *et al.*, 2004, Pester *et al.*, 2012) (Abb. 30).

Diese Spezies sind meist beschränkt auf den Abbau von Toluol und einigen chemisch ähnlichen Analoga wie halogenierte Toluole oder Cresol- und Xylol-Isomere, die offenbar wie Toluol von der BSS akzeptiert und umgesetzt werden (Beller & Spormann, 1999, Müller *et al.*, 1999, Verfürth *et al.*, 2004).

Basierend auf der Sequenz der großen Untereinheit bilden die BSS-Orthologe all dieser Stämme eine monophyletische Gruppe im phylogenetischen Stammbaum. Dabei ist die Verzweigungsordnung, abgesehen von einigen offensichtlichen Fällen von lateralem Gentransfer, von der phylogenetischen Verwandtschaft abhängig. Innerhalb der Sulfatreduzierer können zwei homologe Cluster der BSS gefunden werden. Das erste beinhaltet die  $\delta$ -Proteobakterien zusammen mit den  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -reduzierenden *Geobacter*-Arten, das andere die Gram-positiven Stämme.

Am Übergangspunkt zwischen den BSS-Orthologen von Sulfat- und Nitratreduzierern (Abb. 30) zweigt ein kürzlich identifiziertes *p*-Cymol-aktivierendes FAE des Stamms pCyN2 (Strijkstra *et al.*, 2014), eines nahen Verwandten von *Thauera terpenica* (Heider & Fuchs, 2005), ab. Kürzlich wurden darüber hinaus drei zusätzliche Subfamilien von paralogen FAE-Isoenzymen, die andere aromatische oder aliphatische Verbindungen als Toluol durch Fumarataddition abbauen, in verschiedenen Bakterien identifiziert.

## 2. Analyse zum Reaktionsmechanismus der BSS mittels EPR-Spektroskopie

Der postulierte Reaktionsmechanismus der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase, die Toluol für den weiteren Abbau aktiviert, verläuft über verschiedene radikalische Intermediate, die nach DFT-Berechnung von Maciej Szaleniec unter normalen Reaktionsbedingungen äußerst kurzlebig sind. Das Mengenverhältnis eines Benzylradikals zum Glycylradikal liegt unter

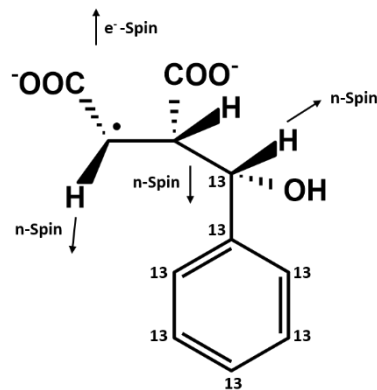
Umsatzbedingungen bei 1:3300, das eines Benzylsuccinylradikals zum Glycylradikal bei 1:700. Daraus folgt, dass das thermodynamische Gleichgewicht der BSS-Reaktion so stark auf der Seite des Glycylradikals liegt, dass mit Toluol als Substrat in EPR-spektroskopischen Analysen keine beobachtbaren radikalischen Intermediate zu erwarten sind, sondern stets ein Glycylradikalspektrum erhalten bleibt. Die Reaktion lässt sich jedoch offenbar durch substratanaloge oder produktanaloge Verbindungen auf der Stufe der radikalischen Intermediate arretieren, sodass Aussagen über Zwischenstufen des Mechanismus gemacht werden können.

Durch die Verwendung von substratanalogen Verbindungen wie Benzylalkohol ist es bereits Markus Hilberg (2012) in seiner Doktorarbeit gelungen, mit bis zu drei Protonen koppelnde, kohlenstoffbasierte Radikalintermediate im Rohextrakt von auf Toluol gewachsenen *T. aromatica* K172-Zellen nachzuweisen. Die Identifizierung und Charakterisierung solcher Intermediate kann einen großen Beitrag zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus der BSS leisten. Mit der Weiterführung der begonnenen Analysen konnten in dieser Arbeit einige offene Fragen beantwortet werden.

Zusätzlich zu den von Hilberg durchgeführten Analysen wurden in dieser Arbeit das Rohextrakt-Lösemittel sowohl gegen  $\text{H}_2\text{O}$  als auch gegen  $\text{D}_2\text{O}$  ausgetauscht. Dadurch wurde nachgewiesen, dass die neue Radikalspezies im aktiven Zentrum der BSS erst durch Reaktion des Inhibitors (Benzylaldehyd oder Benzylalkohol) mit Fumarat entsteht. Diese wurde außerdem auch durch Experimente mit deuterierten Substraten nachgewiesen. Die Beobachtungen aus dieser Arbeit untermauern die Plausibilität des postulierten Mechanismus. Durch den Einsatz von Benzylalkohol mit isotopenmarkiertem  $[2,3\text{-}^2\text{H}_2]$ -Fumarat wurde der Verlust der klassischen Dublettenaufspaltung des Glycylradikals bewirkt. Gleichermäßen blieb der Effekt bei Verwendung von  $[^2\text{H}_2]$ -Benzylalkohol völlig aus. Diese Beobachtungen sind ein Hinweis für die Entstehung der Radikalspezies A des von Hilberg vorgeschlagenen Mechanismus und ein Gegenargument gegen die Beteiligung von Radikalspezies B (Abb. 11). Dabei blieb zu klären, ob es im Falle einer reversiblen Abstrahierung des Deuterium-Atoms von der Hydroxylgruppe des Benzylalkohols durch das Thiylradikal zu einem Austausch der Deuterium-Atome gegen Wasserstoff-Atome des Lösemittels kommen könnte (Hilberg, 2012). Für die Fumarat-Addition an Hexan in *Aromatoleum* sp. HxN1 wurde bei Verwendung von  $[2,3\text{-}^2\text{H}_2]$ -Fumarat gezeigt, dass im gebildeten Succinat-Addukt das Deuteriumatom am C2 des Fumarats ausgetauscht wird

(Rabus *et al.*, 2001). In *T. aromatica* und *Azoarcus* Stamm T wurde bei der Umsetzung von [2,3- $^2\text{H}_2$ ]-Fumarat mit Toluol zu 70 % [2,3- $^2\text{H}_2$ ]-Benzylsuccinat erzeugt (Verfürth, 2005). Durch den Austausch des Rohextrakt-Lösemittels gegen  $\text{D}_2\text{O}$  konnte ein Austausch der Deuteronen mit dem Lösemittel ausgeschlossen werden (Abb. 14, Spektren 15, 18 und 21). Anhand der Daten bleibt die entscheidende Frage zu klären, warum der  $^{13}\text{C}$ -Kern des Benzylalkohols eine Kopplung mit dem Radikal bewirkt, das Proton, welches an diesem Atom gebunden ist, jedoch nicht.

Die Verwendung von [ $^{13}\text{C}_7$ ]-Benzylalkohol hatte sowohl hier, als auch in den Analysen von Hilberg eine Verbreiterung des EPR-Spektrums zu Folge und suggerierte die Entstehung eines mesomeriestabilisierten, allylischen Radikals (Radikalspezies B). Die Existenz zweier verschiedener Radikalspezies ist jedoch eher unwahrscheinlich. Eine mögliche alternative Erklärung könnte in einer unterschiedlichen Spin-Kopplung zwischen den (NMR-aktiven) Kernspins des  $^{13}\text{C}$ -Atoms bzw. des daran gebundenen  $^1\text{H}$ -Atoms und dem lokalisierten Elektronenspin in Radikalspezies A zu finden sein. Möglicherweise kommt mit zunehmender Entfernung zum Radikal die Orientierung der Spinvektoren der Kerne zu dem des Radikals für die Ausbildung des EPR-Spektrums zum Tragen, sodass der Kernspin des  $^{13}\text{C}$ -Atoms einen erkennbaren Effekt produziert, der Kernspin des H-Atoms am  $^{13}\text{C}$ -Atom hingegen nicht (Abb. 14 und Abb. 31). Dafür muss die freie Drehbarkeit des Produktradikal-Moleküls eingeschränkt sein, was durch seine Bindung im aktiven Zentrum der BSS gegeben sein sollte. Durch EPR-analytische Simulationen muss die Plausibilität dieser Theorie allerdings noch gezeigt werden. Um die Auswertung der aufgenommenen Spektren zu erleichtern, ist es außerdem lohnenswert, Hintergrundsignale zu subtrahieren. Dafür besonders geeignet sind die Spektren 5, 16 und 19, bei denen  $^{13}\text{C}$ -Fumarat verwendet wurde (Abb. 14). Dabei sind die tatsächlichen Spektren so weit verbreitert, dass sie nicht mehr zu sehen sind und lediglich das Hintergrundsignal, beispielsweise hervorgerufen durch Flavinradikale, übrigbleibt (Antonio Pierik, persönliche Mitteilung). Gleiches gilt für die in den Spektren 4 und 10 ausgeprägten, seitlichen Flügelstrukturen. Eine weitere Möglichkeit ist die Modellierung des Benzylalkoholradikals im katalytischen Zentrum der BSS mithilfe von DFT-Modellierungsstudien, die von Maciej Szaleniec in Kürze begonnen werden.



**Abbildung 31:** Theoretische Betrachtung des Einflusses der  $^{13}\text{C}$ -Markierung des Benzylalkohols auf das EPR-Spektrum. Das am  $^{13}\text{C}$ -Atom lokalisierte H-Atom hat möglicherweise durch die Entfernung vom Radikal und durch die Orientierung des Spinvektors keinen Einfluss auf das EPR-Spektrum (Abb. 14, vgl. Spektren 3 und 9, 14 und 20).

### 3. Untersuchungen zum Substrat-Spektrum der Benzylsuccinat-Synthase

Das Substratspektrum von *T. aromatica* K172 ist bezüglich der verwerteten Kohlenwasserstoffe sehr eng. Unter anaeroben Bedingungen dient lediglich Toluol als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle (Anders *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu ist *Azoarcus sp.* Stamm T in der Lage, neben Toluol auch *m*-Xylol als Substrat zu nutzen (Dolfing *et al.*, 1990, Seyfried *et al.*, 1994). Zwar können sowohl *Thauera* als auch *Azoarcus* mit *p*-Cresol als Substrat wachsen, jedoch wird *p*-Cresol nicht durch die Addition von Fumarat aktiviert, sondern der Stoffwechsel durch eine sauerstoffunabhängige Methylhydroxylierung eingeleitet (Strijkstra *et al.*, 2014).

Verfürth konnte in seiner Dissertation durch HPLC-Studien zeigen, dass die Benzylsuccinat-Synthase-Enzyme von *Azoarcus sp.* T und *Thauera aromatica* K172 durchaus in der Lage sind, alle Cresol-Isomere umzusetzen, wobei das jeweilige Produkt der Reaktion, die Hydroxybenzylsuccinate, Sackgassenprodukte darstellen und von beiden Stämmen nicht weiter umgesetzt werden. Neben den Cresol-Isomeren ist das Enzym von *Azoarcus sp.* T, nicht aber das von *T. aromatica* K172 in der Lage, alle drei Xylol-Isomere umzusetzen (Krieger *et al.*, 1999, Verfürth *et al.*, 2004).

Neben *o*-Cresol, mit dem Verfürth im Falle der BSS von *T. aromatica* K172 eine ähnliche Aktivität wie für Toluol erzielen konnte (22 mU/mg Protein) wurde in dieser Arbeit versucht, die drei Fluortoluol-Isomere 2-Fluortoluol, 3-Fluortoluol und 4-Fluortoluol umzusetzen.

Darüber hinaus wurde Rohextrakt von *T. aromatica* auch mit 1-Fluormethylbenzol inkubiert. Eine deutlich erkennbare Bildung eines neuen Produkts war allerdings nicht zu sehen. Die Retentionszeiten der Hydroxybenzylsuccinate sind in einer ‚reversed phase-HPLC‘ deutlich kürzer als die von Benzylsuccinat (Verfürth *et al.*, 2004) und bei den Fluor-Benzylsuccinat-Isomeren ist davon auszugehen, dass die Retentionszeit im Vergleich zu Benzylsuccinat ebenfalls verkürzt ist. Zwar konnte keines der Fluorbenzylsuccinat-Isomere als Kontrolle getestet werden, jedoch bestätigt ein Vergleich von Fluorbenzoat mit Benzoat diese Erwartung (Karola Schühle, persönliche Mitteilung). So könnte es sein, dass ein potentiell durch Fluorbenzylsuccinat hervorgerufener Peak vom Peak des verwendeten internen Standards Benzoat verdeckt wird. In nachfolgenden Analysen zur Klärung, ob die Fluortoluol-Derivate von der Benzylsuccinat-Synthase umgesetzt werden, muss gegebenenfalls auf den internen Standard Benzoat verzichtet oder auf einen anderen, unpolaren Standard ausgewichen werden. Marie Lippert konnte in ihrer Dissertation (2009) zeigen, dass die Benzylsuccinat-Synthase von *Thauera aromatica* K172 und die von *Azoarcus sp.* T o-Toluidin mit einer Aminogruppe in *ortho*-Stellung zur Methylgruppe umsetzen können und erzielte dabei Aktivitäten von 9 – 13 % im Vergleich zur Toluolkontrolle. Dabei besaß das Produkt der Reaktion, 2-Aminobenzylsuccinat bei isokratischer Elution eine um eine Minute längere Retentionszeit als Benzylsuccinat. In dieser Arbeit konnte in dieser Region des Chromatogramms keine Bildung eines Peaks beobachtet werden. Sehr wahrscheinlich war die Aktivität des Rohextrakts nicht ausreichend hoch, um 10 % der Aktivität noch detektieren zu können. Um Vergleiche der Substratspezifität zwischen Wildtypenzym und Enzym mit verändertem aktiven Zentrum möglich zu machen, muss die Aktivität des Extrakts entsprechend optimiert werden.

In einem bekannten Isolat eines Sulfat-reduzierenden Bakteriums ist die Aktivierung des Ethylbenzolabbaus durch Addition von Fumarat an die Methylengruppe des Ethylbenzols nachgewiesen worden (Kniemeyer *et al.*, 2003). Anhand der in dieser Arbeit erhobenen Daten ist jedoch die Umsetzung von Ethylbenzol zu 2-(1-Phenylethyl)-succinat durch die BSS von *Thauera aromatica* K172 völlig auszuschließen. Ein Peak, hervorgerufen durch 2-(1-Phenylethyl)-succinat, welches eine längere Retentionszeit als Ethylbenzol haben sollte, wurde nicht detektiert. Ob Ethylbenzol als Inhibitor der BSS fungieren könnte, wurde zum einen über HPLC und zum anderen durch EPR-spektroskopische Analyse getestet. Trotz der Zugabe von Ethylbenzol zum Rohextrakt konnte das Substrat Toluol mit der gleichen Aktivität

wie in der Kontrolle ohne Ethylbenzol umgesetzt werden. Im EPR-Spektrum wurde zudem keine organische Radikalspezies detektiert, die zur Aufklärung des Mechanismus dienen könnte, sondern lediglich das Glycylradikal.

#### 4. Heterologe Überproduktion der BSS und Mutagenesestudien

In vorangegangenen Arbeiten wurde versucht, die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase nach der Reinigung durch das aktivierende Enzym *in vitro* zu aktivieren (Verfürth, 2005). Aufgrund der Schwierigkeit, ein lösliches aktivierendes Protein in ausreichend hoher Aktivität überzuproduzieren und aufgrund der Sauerstoffempfindlichkeit der BSS konnte nur eine sehr geringe Aktivität der BSS erzielt werden. In dieser Arbeit ist es erstmalig gelungen, die *in vivo* aktivierte Benzylsuccinat-Synthase von *T. aromatica* K172 heterolog überzuproduzieren. Mit der im Rohextrakt ermittelten Aktivität von 7,2 mU/mg Protein konnte ca. 1/3 der bisher für *T. aromatica*-Rohextrakt erzielten Aktivität erreicht werden. Dafür wurde *A. aromaticum* EbN1-SR7 mit Benzoat als Substrat kultiviert, was wesentlich unkomplizierter ist, als die Kultivierung mit Toluol und außerdem sicherstellt, dass das genomische *bss*-Operon nicht induziert wird. Dabei ist auch festzuhalten, dass eine Aktivität ohne die Genprodukte der Gene *bssEFGH* erzielt wurde, da diese Gene weder auf dem Plasmid vorhanden waren noch bei Wachstum auf Benzoat induziert werden sollten. Auch durch die vollständige und partielle Deletion des *bss*-Operons von *A. aromaticum* EbN1-SR7 sollte die noch unbekannte Rolle der Gene *bssEFGH* aufgeklärt werden. Dabei konnten Klone isoliert werden, bei denen das ganze *bss*-Operon oder die Gene *bssEFGH* deletiert worden waren.

Das Protein RavA, eine regulatorische ATPase der Vairante A und ein Mitglied der MoxR-AAA<sup>+</sup>-Proteinfamilie (ATPase assoziiert mit mehreren zellulären Aktivitäten) (Snider *et al.*, 2006) hat für die NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I der Atmungskette) von *E. coli* vermutlich die Aufgabe eines Chaperons zur Reifung eines besonderen FeS-Zentrums (Iyer *et al.*, 2004, Frickey & Lupas, 2004). Für MoxR kodierende Gene findet man für gewöhnlich in unmittelbarer Nähe zu Genen, die für Proteine mit Van-Willebrand-Faktor Typ A-Domänen (VWA) kodieren. Im Falle von RavA ist dieses VWA-Protein ViaA und die Gene beider Proteine sind im gleichen Operon lokalisiert (Snider *et al.*, 2006). Obwohl die Funktion des RavA-ViaA-Komplexes *in vivo* unbekannt ist, wird angenommen, dass sie eine ähnliche Funktion wie, den MoxR-Proteinen verwandte, Metallchelatasen erfüllen (Iyer *et al.*, 2004). Metallchelatasen



mit AAA<sup>+</sup>- und VWA-Domänen sind für die Metallion-Inserierung in Proteinen verantwortlich (Fodje *et al.*, 2001). Ähnliches könnte für die im *bss*-Operon lokalisierten Gene *bssE* und *bssF* der Fall sein. Für das BssE-Protein sind ATPase-Domänen, für BssF Van-Willebrand-Faktoren annotiert. Die beiden Proteine könnten also eine ähnliche Funktion wie RavA und ViaA erfüllen und für die Inserierung der Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>-Cluster in die kleinen Untereinheiten der BSS,  $\beta$  und  $\gamma$  zuständig sein (Arai *et al.*, 1999, Snider *et al.*, 2006, Van Spanning *et al.*, 1991, Toyama *et al.*, 1998, Jungst & Zumft, 1992, Bartnikas *et al.*, 1997, Pelzmann *et al.*, 2009, Friedrich *et al.*, 2016).

Bei der Überprüfung des resultierenden Phänotyps der erzeugten Mutanten ist aufgefallen, dass sie in der Lage waren, mit Toluol als alleiniger Kohlenstoffquelle im Medium zu wachsen. Merkwürdigerweise zeigten sie dabei eine ungewöhnlich hohe Wachstumsrate und eine ungewöhnlich kurze Verdopplungszeit. Ein gut auf Toluol adaptierter Stamm sollte sich innerhalb von 12 Stunden nur einmal teilen (Champion *et al.*, 1999). Dass die Stämme eine doppelt so hohe Wachstumsrate besitzen und außerdem auch ohne extern zugegebenes Substrat wachsen können, lässt darauf schließen, dass nicht Toluol für das Wachstum verantwortlich ist. Viel wahrscheinlicher ist dagegen ein Wachstum mit eingelagertem PHB als Kohlenstoffquelle, wie dies von Trautwein *et al.* (2008) beobachtet wurde.

Durch kürzlich veröffentlichte Kristallstrukturen der BSS und darauf basierende Modellierung-Daten war es möglich, eine Reihe von Aminosäuren in BssA zu identifizieren, die im Mechanismus der BSS eine Schlüsselrolle spielen könnten (Funk *et al.*, 2014, Funk *et al.*, 2015, Szaleniec & Heider, 2016). Dabei wurde das putative aktive Zentrum von BssA auch mit anderen Fumarat-addierenden BSS-orthologen Enzymen, die eine hohe Sequenzähnlichkeit zu BssA aufweisen, verglichen.

Der Sulfatreduzierer *Desulfobacula toluolica* beinhaltet direkt neben dem *bss*-Operon ein zusätzliches Operon für ein FAE, welches spezifisch *p*-Cresol aktiviert (Wöhlbrand *et al.*, 2013). Die Sequenz der großen Untereinheit bildet dabei im phylogenetischen Stammbaum zusammen mit Sequenzen einiger nah verwandter FAEs ein eigenes Cluster und werden als tentative *p*-Cresol-spezifische *p*-Hydroxybenzylsuccinat-Synthasen (HBSS) angesehen. Die Sequenzähnlichkeit zwischen BssA und HbsA, den großen Untereinheiten beider Enzyme, liegt bei 54 %.

In verschiedenen Naphthalin und 2-Methylnaphthalin-abbauenden Sulfat-reduzierenden Isolaten wie auch Anreicherungskulturen konnten FAEs gefunden werden, die 2-Methylnaphthalin zu 2-(2-Methylnaphthalin)-succinat umsetzen (Galushko *et al.*, 1999, Musat *et al.*, 2009, Selesi *et al.*, 2009). Phylogenetische Studien der großen Untereinheiten dieser (2-Naphthylmethyl)-succinat-Synthase zeigten, dass auch diese ein eigenes homologes NMS-Cluster mit geringerer Sequenzkonservierung bezüglich der BSS und HBSS-Paralogen bilden. Die Sequenzähnlichkeit zwischen BssA und NmsA, den großen Untereinheiten beider Enzyme, liegt bei 49 %.

Die beiden denitrifizierenden  $\beta$ -Proteobakterien *A. aromaticum* pCyN1 und *Thauera sp.* pCyN2 können auf zwei unterschiedlichen Wegen *p*-Cymol anaerob abbauen (Strijkstra *et al.*, 2014). Während *A. aromaticum* pCyN1 *p*-Cymol durch die *p*-Cymol-Dehydrogenase unter Bildung von *p*-Isopropyl-Benzylalkohol hydroxyliert, besitzt *Thauera sp.* pCyN2 die BSS-homologe 4-Isopropylbenzylsuccinat-Synthase IbsABCDEF und sogar homologe Enzyme zum  $\beta$ -Oxidationsweg BisABCDEFGH. IbsA, die große  $\alpha$ -Untereinheit des Enzyms, besitzt Sequenzähnlichkeit zu BssA von 72 %.

Besonderes Augenmerk bei der Mutagenese von Aminosäuren des putativen aktiven Zentrums galt in dieser Arbeit drei verschiedenen Zielgruppen. Die Isoleucinreste Ile617 und Ile620 in der BSS von *T. aromatica* K172 sind in den Enzymen der *m*-Xylol-abbauenden Stämme *Azoarcus sp.* CIB und *Azoarcus sp.* T zu Valin verändert und könnten bei der Bindung und Umsetzung von *m*-Xylol, zu der *T. aromatica* K172 nicht in der Lage ist, eine Rolle spielen. Um dies zu überprüfen und ggf. das Substratspektrum des Enzyms zu erweitern, wurden die Isoleucinreste der BSS von *T. aromatica* K172 zu Valin oder zu Glutamin verändert.

Dem Argininrest Arg508 wurde in den jüngsten Studien eine Schlüsselrolle bei der Bindung von Fumarat zugesprochen, weil er sehr wahrscheinlich eine nicht-protonierte Carboxylgruppe von Fumarat bindet und so das Kosubstrat im aktiven Zentrum fixiert. (Szaleniec & Heider, 2016). Um diese Annahme zu bestätigen und gegebenenfalls das Substratspektrum auf andere Fumarat-ähnliche Substrate zu erweitern, war der Argininrest ein wichtiges Ziel der in dieser Arbeit begonnenen Mutagenesestudien.

Als letztes Ziel und durch die Möglichkeit durch künstliche tRNAs sogar Selenocystein ohne nötiges SECIS-Element in die BSS einzuführen, wurde das für Cystein kodierende Codon auf dem verwendeten Plasmid zu den beiden Stoppcodons UAG und UGA verändert.

Selenocystein (2-Selenoalanin) wurde 1976 als 21. proteinogene Aminosäure als eine Komponente des Glycin-Reduktase-Komplexes in *Clostridium sticklandii* nachgewiesen (Cone *et al.*, 1976). Es unterscheidet sich strukturell von Cystein lediglich durch eine Selenogruppe anstatt einer Thiolgruppe. Die chemischen Unterschiede sind weitreichender. Selenocystein hat mit -488 mV ein deutlich negativeres Redoxpotential als Cystein mit -233 mV (Arner, 2010, Jacob *et al.*, 2003). Dies macht Selenocystein zu einem starken Nukleophil und weitaus reaktiver als Cystein (Axley *et al.*, 1991). Dadurch lässt sich nachvollziehen, dass Selenocystein meist im aktiven Zentrum von Proteinen zu finden und an der Katalyse beteiligt ist. Ob Selenocystein auch in der BSS eine ähnliche oder höhere Aktivität als Cystein hervorbringt, ist unklar. Der  $pK_s$ -Wert der Selenogruppe bei physiologischem pH-Wert ist mit 3,73 weit unter dem der Thiolgruppe mit 6,96 (Johansson *et al.*, 2005). Die Selenogruppe liegt folglich bei physiologischem pH-Wert deprotoniert vor, die Thiolgruppe bildet unter diesen Bedingungen jedoch noch kein Anion (Stadtman, 1996).

Es wird angenommen, dass das Radikal vor der Reaktion vom Glycinrest auf den Cysteinrest übertragen wird, indem vom Cysteinrest ein Wasserstoffatom abstrahiert wird. Da die Thiolgruppe bei physiologischem pH-Wert protoniert vorliegt, ist das leicht vorstellbar. Selenocystein hätte nach seinem  $pK_s$ -Wert gar kein Wasserstoffatom vorzuweisen, welches vom Glycinrest abstrahiert werden könnte. Falls die Aktivität des Enzyms durch die Mutation verloren ginge, wäre nachgewiesen, dass der Cysteinrest aktiv an der Reaktion beteiligt sein muss.

Neben dem Austausch einzelner Codons im *bssA*-Gen des Plasmid pASG3bssStrep+ori1 wurden in dieser Arbeit die beiden aus *T. aromatica* K172 stammenden und auf dem Plasmid befindlichen Gene *bssA* und *bssB* vollständig durch Analoga aus *Geobacter metallireducens* ersetzt. Nach einem Transfer in *A. aromaticum* EbN1-SR7 mit anschließender Überproduktion könnten mit dem zellfreien Extrakt in der Zukunft ebenfalls aufschlussreiche substratspezifische Aktivitätsanalysen durchgeführt und mit denen aus *T. aromatica* K172 verglichen werden. Außerdem könnte das chimäre Protein gereinigt und kristallisiert werden. Die Überexpression der *bss*-Gene in *trans* durch das Plasmid pASG3bssStrep+ori1 erlaubt die einfache Erzeugung von Mutanten mit veränderten BssA-Aminosäuresequenzen. Durch Bestimmung der Substratspezifität und der Aktivität dieser mutierten Proteine im Rohextrakt könnten Rückschlüsse auf den Reaktionsmechanismus gezogen werden. Durch Optimierung der Strep-Tag-Reinigung könnte mit wenig Aufwand sehr wahrscheinlich eine *in vivo* aktivierte

und nach wie vor aktive BSS erhalten werden, die für nachfolgende Untersuchungen genutzt werden kann.

## 5. Aufklärung der Stereospezifität der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase

1998/99 konnte nachgewiesen werden, dass durch die Reaktion der BSS ausschließlich (*R*)-Benzylsuccinat gebildet wird (Beller & Spormann, 1998, Leutwein & Heider, 1999). Die möglichen thermodynamischen Gründe für diese Präferenz wurden 2016 von Szaleniec und Heider erläutert.

Demnach könnte die Regioselektivität bei der Bildung von ausschließlich (*R*)-Benzylsuccinat durch die Auslöschung des Produktradikals (Schritt TS3, Abb. 4) kontrolliert werden, wobei das Benzylradikal vorzugsweise am distalen C3-Atom des Fumarats (relativ zu Cys493) angreift. Während die Energiebarrieren der Intermediate für den Angriff beider Atome auf die Doppelbindung identisch zu sein scheinen, ist die Energiebarriere zur Auslöschung des Benzylsuccinatrakals mit der Abstrahierung des Wasserstoffatoms vom Cys493 für das falsche Regioisomer mit ca. 50 kcal/mol sehr hoch, da es das Aufbrechen der starken Salzbrücke mit Arg508 und zusätzlicher Wasserstoffbrückenbindungen voraussetzt. Die Bindung an Fumarat in der pro-(*S*)-Position resultiert in der umgekehrten Präferenz der Stereoselektivität, sodass es zum bevorzugten Angriff des Benzylradikals ans proximale C2-Atom kommt. Da aber dieser Pfad durch sehr hohe Energiebarrieren der Radikalauslöschung gekennzeichnet ist, kommt es nicht zur Bildung von (*S*)-Benzylsuccinat. Wird die C-C-Bindung mit dem distalen C3-Atom des Fumarats geknüpft, bleiben alle Reagenzien während der Auslöschung des Radikals an Ort und Stelle und es gibt keine Repositionierungseffekte. Wenn das falsche Radikalintermediat gebildet wird, kommt es wahrscheinlich zu einer Umkehr zum vorangegangenen Intermediat, sodass es nachträglich zum richtigen Reaktionspfad gelangt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es bei der Addition von Fumarat an das Benzylradikal zu einer Inversion des Chiralitätszentrums bei der Verwendung von (*R*)- und (*S*)-Toluol kommt.

Unter anderem entscheidend für den Erfolg des Experiments war die Möglichkeit, Benzylsuccinat enzymatisch zu Phenylitaconyl-CoA umzusetzen. Vor der Etablierung eines Protokolls zur Reinigung der Succinyl-CoA:Benzy succinat-CoA-Transferase durch Karola Schühle wurde versucht, den CoA-Ester von Benzylsuccinat, Benzylsuccinyl-CoA, chemisch zu

synthetisieren. Dabei wurde eine Ausbeute von lediglich 33 % erreicht. Eine weit bessere Ausbeute brachte die enzymatische Umsetzung mit einer Ausbeute von über 90 %, sodass so wenig markierte Intermediate wie möglich durch schlechte Ausbeute verloren gehen. Auch die auf der Basis der Kristallstruktur der BSS veröffentlichten Modelling-Daten von Szaleniec und Heider (2016) unterstützen die aus den experimentellen Daten gezogene Schlussfolgerung, Fumarat addiere in Form einer Inversion der chiralen Methylgruppe von (*R*)- und (*S*)-Toluol an das Benzylradikal. Die Abstrahierung des Wasserstoffatoms von der Methylgruppe des Toluols scheint, belegt durch die Bestimmung des kinetischen Isotopeneffekts von Li und Marsh (2006) und Markus Hilberg (2012), der geschwindigkeitslimitierende Schritt zu sein. Die Re-Addition des Wasserstoffatoms an den Succinatrest des Benzylsuccinats folgt dem Mechanismus einer *syn*-Addition (Qiao & Marsh, 2005, Szaleniec & Heider, 2016).

Die beobachtete Stereospezifität ist analog zu kürzlich veröffentlichten Daten von Jarling *et al.* (2012), die eine Inversion der chiral markierten Methylengruppe von n-Hexan durch das Enzym 1-Methylalkylsuccinat-Synthase (MASS), ein weiteres Fumarat-addierendes Enzym im anaeroben Hexanabbau mit 35 % Sequenzähnlichkeit zur BSS, beschreiben.

Anaerobe Alkanabbauer sind in denitrizierenden *Rhodocyclaceae* wie z.B. *Aromatoleum sp.* HxN1 genauso vertreten wie in Sulfat-reduzierenden Gattungen wie *Desulfatibacillum* oder *Desulfoglaeba*. Sie haben mit den Alkansuccinat-Synthasen (ASS) spezielle Gruppen von FAEs. (Callaghan *et al.*, 2008, Callaghan *et al.*, 2010, Grundmann *et al.*, 2008, Rabus *et al.*, 2001). Auffällig ist dabei die Unterteilung in drei Subgruppen für kurzkettige Alkane wie Propan und Butan (Jaekel *et al.*, 2013, Kniemeyer *et al.*, 2007, Musat, 2015), mittelkettige Alkane wie Hexan oder Octan (Grundmann *et al.*, 2008, Rabus *et al.*, 2001, Zedelius *et al.*, 2011) und langkettige Alkane mit mehr als 10 C-Atomen (Callaghan, 2013a, Callaghan, 2013b) zu erkennen. Mit Ausnahme der Propanaktivierung, bei dem Fumarat entweder an die sekundäre Methylengruppe oder an eine der primären Methylgruppen addiert wird (Kniemeyer *et al.*, 2007), kommt es bei allen anderen Alkanen zur Addition von Fumarat an die subterminale Methylengruppe.

Anhand der Sequenzen der betreffenden Operons scheinen Alkan-aktivierende FAEs mindestens eine zusätzliche Untereinheit mit FeS-Cluster im Vergleich zur BSS oder eines anderen FAEs zu besitzen. So findet man zusätzliche Gene, die für hochkonservierte kleine Proteine mit charakteristische Cys-reichen Sequenzmotiven kodieren, die möglicherweise die

untypischen FeS-Cluster, die in den kleinen Untereinheiten der BSS gefunden worden, koordinieren könnten.

Durch die Verwendung von chiralem n-Hexan, welches an beiden Kohlenstoffatomen C2 und C5 mit den Wasserstoffisotopen  $^1\text{H}$  und  $^2\text{H}$  markiert war, konnten Jarling *et al.* (2012) zeigen, dass das Produkt 1-Methylpentylsuccinat einer Inversion der Konfiguration am C2-Atom durch eine *syn*-Addition des Hexans an Fumarat entstammt. Gleiches wurde für die Reaktion der Benzylsuccinat-Synthase angenommen. In dieser Arbeit gelang es nun, zu zeigen, dass es bei der Bildung von Benzylsuccinat durch eine *syn*-Addition des Toluols an Fumarat zu einer Inversion der Konfiguration der Methylgruppe des Toluols ähnlich einer konzertierten  $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion kommt.

## VIII. Literaturverzeichnis

- Abu Laban, N., Tan, B., Dao, A. & Foght, J., (2015)** Draft Genome Sequence of Uncultivated Toluene-Degrading *Desulfobulbaceae* Bacterium Tol-SR, Obtained by Stable Isotope Probing Using [ $^{13}\text{C}_6$ ]Toluene. *Genome Announc.* **3**.
- Achong, G.R., Rodriguez, A.M. & Spormann, A.M., (2001)** Benzylsuccinate synthase of *Azoarcus* sp. strain T: cloning, sequencing, transcriptional organization, and its role in anaerobic toluene and *m*-xylene mineralization. *J. Bacteriol.* **183**: 6763-6770.
- Aeckersberg, F., Bak, F. & Widdel, F., (1991)** Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to  $\text{CO}_2$  by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Arch. Microbiol.*
- Aklujkar, M., Krushkal, J., DiBartolo, G., Lapidus, A., Land, M.L. & Lovley, D.R., (2009)** The genome sequence of *Geobacter metallireducens*: features of metabolism, physiology and regulation common and dissimilar to *Geobacter sulfurreducens*. *BMC Microbiol.* **9**: 109.
- Aldag, C., Brocker, M.J., Hohn, M.J., Prat, L., Hammond, G., Plummer, A. & Söll, D., (2013)** Rewiring translation for elongation factor Tu-dependent selenocysteine incorporation. *Angew. Chem.* **52**: 1441-1445.
- Altenschmidt, U. & Fuchs, G., (1991)** Anaerobic degradation of toluene in denitrifying *Pseudomonas* sp.: indication for toluene methylhydroxylation and benzoyl-CoA as central aromatic intermediate. *Arch. Microbiol.* **156**: 152-158.
- Anders, H.J., Kaetzke, A., Kampfer, P., Ludwig, W. & Fuchs, G., (1995)** Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying pseudomonad strains K 172 and KB 740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of the Proteobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 327-333.
- Arai, H., Kodama, T. & Igarashi, Y., (1999)** Effect of nitrogen oxides on expression of the *nir* and *nor* genes for denitrification in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **170**: 19-24.
- Arner, E.S., (2010)** Selenoproteins-What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? *Exp. Cell Res.* **316**: 1296-1303.
- Axley, M.J., Böck, A. & Stadtman, T.C., (1991)** Catalytic properties of an *Escherichia coli* formate dehydrogenase mutant in which sulfur replaces selenium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8450-8454.
- Baron, C., Heider, J. & Böck, A., (1993)** Interaction of translation factor SELB with the formate dehydrogenase H selenopolypeptide mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 4181-4185.
- Bartnikas, T.B., Tosques, I.E., Laratta, W.P., Shi, J. & Shapleigh, J.P., (1997)** Characterization of the nitric oxide reductase-encoding region in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. *J. Bacteriol.* **179**: 3534-3540.
- Beller, H.R., Reinhard, M. & Grbić-Galić, D., (1992)** Metabolic by-products of anaerobic toluene degradation by sulfate-reducing enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3192-3195.
- Beller, H.R. & Spormann, A.M., (1997a)** Anaerobic activation of toluene and *o*-xylene by addition to fumarate in denitrifying strain T. *J. Bacteriol.* **179**: 670-676.
- Beller, H.R. & Spormann, A.M., (1997b)** Benzylsuccinate Formation as a Means of Anaerobic Toluene Activation by Sulfate-Reducing Strain PRTOL1. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3729-3731.

- Beller, H.R. & Spormann, A.M., (1998)** Analysis of the novel benzylsuccinate synthase reaction for anaerobic toluene activation based on structural studies of the product. *J. Bacteriol.* **180**: 5454-5457.
- Beller, H.R. & Spormann, A.M., (1999)** Substrate range of benzylsuccinate synthase from *Azoarcus* sp. strain T. *FEMS Microbiol. Lett.* **178**: 147-153.
- Beller, H.R., Spormann, A.M., Sharma, P.K., Cole, J.R. & Reinhard, M., (1996)** Isolation and characterization of a novel toluene-degrading, sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1188-1196.
- Berry, M.J., Banu, L., Chen, Y.Y., Mandel, S.J., Kieffer, J.D., Harney, J.W. & Larsen, P.R., (1991)** Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. *Nature* **353**: 273-276.
- Bertani, G., (1951)** Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**: 293-300.
- Bharadwaj, V.S., Dean, A.M. & Maupin, C.M., (2013)** Insights into the glycyl radical enzyme active site of benzylsuccinate synthase: a computational study. *J. Am. Chem. Soc.* **135**: 12279-12288.
- Biegert, T., Fuchs, G. & Heider, J., (1996)** Evidence that anaerobic oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate. *Eur. J. Biochem.* **238**: 661-668.
- Birnboim, H.C. & Doly, J., (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Boll, M., (2005)** Key enzymes in the anaerobic aromatic metabolism catalysing Birch-like reductions. *Biochim. Biophys. Acta* **1707**: 34-50.
- Boll, M., Albracht, S.S. & Fuchs, G., (1997)** Benzoyl-CoA reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. A study of adenosinetriphosphatase activity, ATP stoichiometry of the reaction and EPR properties of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* **244**: 840-851.
- Bozinovski, D., Taubert, M., Kleinsteuber, S., Richnow, H.-H.H., von Bergen, M., Vogt, C. & Seifert, J., (2014)** Metaproteogenomic analysis of a sulfate-reducing enrichment culture reveals genomic organization of key enzymes in the *m*-xylene degradation pathway and metabolic activity of proteobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **37**: 488-501.
- Bradford, M.M., (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Buckel, W. & Golding, B.T., (2006)** Radical Enzymes in Anaerobes. *Microbiology* **60**: 27-49.
- Butler, J.E., He, Q., Nevin, K.P., He, Z., Zhou, J. & Lovley, D.R., (2007)** Genomic and microarray analysis of aromatics degradation in *Geobacter metallireducens* and comparison to a *Geobacter* isolate from a contaminated field site. *BMC Genomics* **8**: 180.
- Callaghan, A.V., (2013a)** Enzymes involved in the anaerobic oxidation of n-alkanes: from methane to long-chain paraffins. *Frontiers in Microbiology* **4**: 89.
- Callaghan, A.V., (2013b)** Metabolomic investigations of anaerobic hydrocarbon-impacted environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* **24**: 506-515.
- Callaghan, A.V., Davidova, I.A., Savage-Ashlock, K., Parisi, V.A., Gieg, L.M., Suflita, J.M., Kukor, J.J. & Wawrik, B., (2010)** Diversity of benzyl- and alkylsuccinate synthase genes in hydrocarbon-impacted environments and enrichment cultures. *Environ. Sci. Technol.* **44**: 7287-7294.



- Callaghan, A.V., Gieg, L.M., Kropp, K.G., Suflita, J.M. & Young, L.Y., (2006)** Comparison of mechanisms of alkane metabolism under sulfate-reducing conditions among two bacterial isolates and a bacterial consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 4274-4282.
- Callaghan, A.V., Wawrik, B., Ní Chadhain, S.M.M., Young, L.Y. & Zylstra, G.J., (2008)** Anaerobic alkane-degrading strain AK-01 contains two alkylsuccinate synthase genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **366**: 142-148.
- Camilli, R., Reddy, C.M., Yoerger, D.R., Van Mooy, B.A., Jakuba, M.V., Kinsey, J.C., McIntyre, C.P., Sylva, S.P. & Maloney, J.V., (2010)** Tracking hydrocarbon plume transport and biodegradation at Deepwater Horizon. *Science* **330**: 201-204.
- Champion, K.M., Zengler, K. & Rabus, R., (1999)** Anaerobic degradation of ethylbenzene and toluene in denitrifying strain EbN1 proceeds via independent substrate-induced pathways. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 157-164.
- Cohr, K.H. & Stokholm, J., (1979)** Toluene. A toxicologic review. *Scand. J. Work Environ. Health* **5**: 71-90.
- Cone, J.E., Del Rio, R.M., Davis, J.N. & Stadtman, T.C., (1976)** Chemical characterization of the selenoprotein component of clostridial glycine reductase: identification of selenocysteine as the organoselenium moiety. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 2659-2663.
- Coschigano, P.W., (2000)** Transcriptional analysis of the *tutE tutFDGH* gene cluster from *Thauera aromatica* strain T1. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1147-1151.
- Coschigano, P.W., Wehrman, T.S. & Young, L.Y., (1998)** Identification and analysis of genes involved in anaerobic toluene metabolism by strain T1: putative role of a glycine free radical. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1650-1656.
- Coschigano, P.W. & Young, L.Y., (1997)** Identification and sequence analysis of two regulatory genes involved in anaerobic toluene metabolism by strain T1. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 652-660.
- Craciun, S. & Balskus, E.P., (2012)** Microbial conversion of choline to trimethylamine requires a glycy radical enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**: 21307-21312.
- Craciun, S., Marks, J.A. & Balskus, E.P., (2014)** Characterization of choline trimethylamine-lyase expands the chemistry of glycy radical enzymes. *ACS Chem. Biol.* **9**: 1408-1413.
- Cupples, A.M., (2011)** The use of nucleic acid based stable isotope probing to identify the microorganisms responsible for anaerobic benzene and toluene biodegradation. *J. Microbiol. Methods* **85**: 83-91.
- Dehio, C. & Meyer, M., (1997)** Maintenance of broad-host-range incompatibility group P and group Q plasmids and transposition of Tn5 in *Bartonella henselae* following conjugal plasmid transfer from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**: 538-540.
- Dolfing, J., Zeyer, J. & Binder-Eicher, P., (1990)** Isolation and characterization of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. *Arch. Microbiol.* **154**: 336-341.
- Dower, W.J., Miller, J.F. & Ragsdale, C.W., (1988)** High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**: 6127-6145.
- Eklund, H. & Fontecave, M., (1999)** Glycy radical enzymes: a conservative structural basis for radicals. *Structure* **7**: 62.
- Evans, P.J., Ling, W., Goldschmidt, B., Ritter, E.R. & Young, L.Y., (1992)** Metabolites formed during anaerobic transformation of toluene and *o*-xylene and their proposed relationship to the initial steps of toluene mineralization. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 496-501.

- Evans, P.J., Mang, D.T., Kim, K.S. & Young, L.Y., (1991) Anaerobic degradation of toluene by a denitrifying bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1139-1145.
- Feil, C., (2006) Biochemie des anaeroben Toluol-Stoffwechsels von *Thauera aromatica*. Dissertation, Technische Hochschule Darmstadt.
- Fodje, M.N., Hansson, A., Hansson, M., Olsen, J.G., Gough, S., Willows, R.D. & Al-Karadaghi, S., (2001) Interplay between an AAA module and an integrin I domain may regulate the function of magnesium chelatase. *J. Mol. Biol.* **311**: 111-122.
- Forchhammer, K., Leinfelder, W. & Böck, A., (1989) Identification of a novel translation factor necessary for the incorporation of selenocysteine into protein. *Nature* **342**: 453-456.
- Fowler, S.J., Gutierrez-Zamora, M.-L.L., Manefield, M. & Gieg, L.M., (2014) Identification of toluene degraders in a methanogenic enrichment culture. *FEMS Microbiol. Ecol.* **89**: 625-636.
- Frazer, A.C., Coschigano, P.W. & Young, L.Y., (1995) Toluene metabolism under anaerobic conditions: a review. *Anaerobe* **1**: 293-303.
- Frickey, T. & Lupas, A.N., (2004) Phylogenetic analysis of AAA proteins. *J. Struc. Biol.* **146**: 2-10.
- Friedrich, T., Dekovic, D.K. & Burschel, S., (2016) Assembly of the *Escherichia coli* NADH:ubiquinone oxidoreductase (respiratory complex I). *Biochim. Biophys. Acta* **1857**: 214-223.
- Fuchs, G., Boll, M. & Heider, J., (2011) Microbial degradation of aromatic compounds - from one strategy to four. *Nature Reviews. Microbiology* **9**: 803-816.
- Funk, M.A., Judd, E.T., Marsh, E.N., Elliott, S.J. & Drennan, C.L., (2014) Structures of benzylsuccinate synthase elucidate roles of accessory subunits in glycyl radical enzyme activation and activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**: 10161-10166.
- Funk, M.A., Marsh, E.N. & Drennan, C.L., (2015) Substrate-bound structures of benzylsuccinate synthase reveal how toluene is activated in anaerobic hydrocarbon degradation. *J. Biol. Chem.* **290**: 22398-22408.
- Galushko, A.S., Minz, D., Schink, B. & Widdel, F., (1999) Anaerobic degradation of naphthalene by a pure culture of a novel type of marine sulphate-reducing bacterium. *Environ. Microbiol.* **5**: 415-420.
- Grundmann, O., Behrends, A., Rabus, R., Amann, J., Halder, T., Heider, J. & Widdel, F., (2008) Genes encoding the candidate enzyme for anaerobic activation of n-alkanes in the denitrifying bacterium strain HxN1. *Environ. Microbiol.* **10**: 376-385.
- Harms, G., Rabus, R. & Widdel, F., (1999a) Anaerobic oxidation of the aromatic plant hydrocarbon *p*-cymene by newly isolated denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* **172**: 303-312.
- Harms, G., Zengler, K., Rabus, R., Aeckersberg, F., Minz, D., Rosselló-Mora, R. & Widdel, F., (1999b) Anaerobic oxidation of *o*-xylene, *m*-xylene, and homologous alkylbenzenes by new types of sulfate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 999-1004.
- Heider, J., Baron, C. & Böck, A., (1992) Coding from a distance: dissection of the mRNA determinants required for the incorporation of selenocysteine into protein. *EMBO J.* **11**: 3759-3766.
- Heider, J. & Fuchs, G., (2005) Genus *Thauera*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Springer Verlag Berlin Vol. 2: 907-913.
- Heider, J. & Rabus, R., (2008) *Genomic insights in the anaerobic biodegradation of organic pollutants*.

- Heider, J., Szaleniec, M., Martins, B.M., Seyhan, D., Buckel, W. & Golding, B.T., (2016) Structure and Function of Benzylsuccinate Synthase and Related Fumarate-Adding Glycyl Radical Enzymes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 29-44.
- Hermuth, K., Leuthner, B. & Heider, J., (2002) Operon structure and expression of the genes for benzylsuccinate synthase in *Thauera aromatica* strain K172. *Arch. Microbiol.* **177**: 132-138.
- Hilberg, M., (2012) Anaerober Toluol-Stoffwechsel in *Thauera aromatica*: Biochemische und spektroskopische Untersuchungen zur Reaktion der (R)-Benzylsuccinat Synthase. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.
- Hilberg, M., Pierik, A.J., Eckhard, B., Lippert, M.L. & Heider, J., (2011) Identification of FeS clusters in the glycyl-radical enzyme benzylsuccinate synthase via EPR and Mössbauer spectroscopy. *J. Biol. Inorg. Chem.* **17**: 49-56.
- Himo, F., (2002) Catalytic Mechanism of Benzylsuccinate Synthase, a Theoretical Study. *J. Phys. Chem. B* **106**: 76887692.
- Himo, F., (2005) C-C bond formation and cleavage in radical enzymes, a theoretical perspective. *Biochim. Biophys. Acta* **1707**: 24-33.
- Hogg, J., (2008) Untersuchungen zu den an der initialen Reaktion des anaeroben Toluolabbaus beteiligten Proteine aus *Thauera aromatica* und der Glycerindehydratase aus *Rhodospirillum rubrum*. Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau.
- Hüttenhofer, A. & Böck, A., (1998) Selenocysteine inserting RNA elements modulate GTP hydrolysis of elongation factor SelB. *Biochemistry* **37**: 885-890.
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H., (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Iyer, L.M., Leipe, D.D., Koonin, E.V. & Aravind, L., (2004) Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J. Struc. Biol.* **146**: 11-31.
- Jacob, C., Giles, G.I., Giles, N.M. & Sies, H., (2003) Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function. *Angew. Chem.* **42**: 4742-4758.
- Jaekel, U., Musat, N., Adam, B., Kuypers, M., Grundmann, O. & Musat, F., (2013) Anaerobic degradation of propane and butane by sulfate-reducing bacteria enriched from marine hydrocarbon cold seeps. *ISME J.* **7**: 885-895.
- Jaekel, U., Zedelius, J., Wilkes, H. & Musat, F., (2015) Anaerobic degradation of cyclohexane by sulfate-reducing bacteria from hydrocarbon-contaminated marine sediments. *Frontiers in Microbiology* **6**.
- Jarling, R., Sadeghi, M., Drozdowska, M., Lahme, S., Buckel, W., Rabus, R., Widdel, F., Golding, B.T. & Wilkes, H., (2012) Stereochemical investigations reveal the mechanism of the bacterial activation of n-alkanes without oxygen. *Angew. Chem.* **51**: 1334-1338.
- Johansson, L., Gafvelin, G. & Arner, E.S., (2005) Selenocysteine in proteins-properties and biotechnological use. *Biochim. Biophys. Acta* **1726**: 1-13.
- Juárez, J.F., Zamarro, M.T.T., Eberlein, C., Boll, M., Carmona, M. & Díaz, E., (2013) Characterization of the mbd cluster encoding the anaerobic 3-methylbenzoyl-CoA central pathway. *Environ. Microbiol.* **15**: 148-166.
- Jungst, A. & Zumft, W.G., (1992) Interdependence of respiratory NO reduction and nitrite reduction revealed by mutagenesis of nirQ, a novel gene in the denitrification gene cluster of *Pseudomonas stutzeri*. *FEBS Lett.* **314**: 308-314.
- Kleindienst, S., Herbst, F.A., Stagars, M., von Netzer, F., Von Bergen, M., Seifert, J., Peplies, J., Amann, R., Musat, F., Lueders, T. & Knittel, K., (2014) Diverse sulfate-reducing

- bacteria of the *Desulfosarcina/Desulfococcus* clade are the key alkane degraders at marine seeps. *ISME J.* **8**: 2029-2044.
- Klinman, J.P., (1991) *Enzyme mechanism from isotope effects*. CRC Press, Boca Raton.
- Knappe, J. & Sawers, G., (1990) A radical-chemical route to acetyl-CoA: the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **6**: 383-398.
- Kniemeyer, O., Fischer, T. & Wilkes, H., (2003) Anaerobic degradation of ethylbenzene by a new type of marine sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Kniemeyer, O., Musat, F., Sievert, S.M., Knittel, K., Wilkes, H., Blumenberg, M., Michaelis, W., Classen, A., Bolm, C., Joye, S.B. & Widdel, F., (2007) Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria. *Nature* **449**: 898-901.
- Krieger, C.J., Beller, H.R., Reinhard, M. & Spormann, A.M., (1999) Initial reactions in anaerobic oxidation of *m*-xylene by the denitrifying bacterium *Azoarcus* sp. strain T. *J. Bacteriol.* **181**: 6403-6410.
- Krieger, C.J., Roseboom, W., Albracht, S.P. & Spormann, A.M., (2001) A stable organic free radical in anaerobic benzylsuccinate synthase of *Azoarcus* sp. strain T. *J. Biol. Chem.* **276**: 12924-12927.
- Kube, M., Heider, J., Amann, J., Hufnagel, P., Kühner, S., Beck, A., Reinhardt, R. & Rabus, R., (2004) Genes involved in the anaerobic degradation of toluene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch. Microbiol.* **181**: 182-194.
- Kühner, S., Wöhlbrand, L., Fritz, I., Wruck, W., Hultschig, C., Hufnagel, P., Kube, M., Reinhardt, R. & Rabus, R., (2005) Substrate-dependent regulation of anaerobic degradation pathways for toluene and ethylbenzene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *J. Bacteriol.* **187**: 1493-1503.
- Laemmli, U.K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Leinfelder, W., Zehelein, E., Mandrand-Berthelot, M.A. & Böck, A., (1988) Gene for a novel tRNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine. *Nature* **331**: 723-725.
- Lenz, H. & Eggerer, H., (1976) Enzymic generation of chiral acetates. A quantitative evaluation of their configurational assay. *Eur. J. Biochem.* **65**: 237-246.
- Leuthner, B., (1999) Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zum anaeroben Metabolismus von Toluol in dem denitrifizierenden Bakterium *Thauera aromatica*. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau.
- Leuthner, B. & Heider, J., (1998) A two-component system involved in regulation of anaerobic toluene metabolism in *Thauera aromatica*. *FEMS Microbiol. Lett.* **166**: 35-41.
- Leuthner, B. & Heider, J., (2000) Anaerobic toluene catabolism of *Thauera aromatica*: the *bbs* operon codes for enzymes of beta oxidation of the intermediate benzylsuccinate. *J. Bacteriol.* **182**: 272-277.
- Leuthner, B., Leutwein, C., Schulz, H., Hörth, P., Haehnel, W., Schiltz, E., Schägger, H. & Heider, J., (1998) Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glycyl radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. *Mol. Microbiol.* **28**: 615-628.
- Leutwein, C. & Heider, J., (1999) Anaerobic toluene-catabolic pathway in denitrifying *Thauera aromatica*: activation and beta-oxidation of the first intermediate, (R)-(+)-benzylsuccinate. *Microbiology* **145** ( Pt 11): 3265-3271.

- Leutwein, C. & Heider, J., (2001)** Succinyl-CoA:(*R*)-benzylsuccinate CoA-transferase: an enzyme of the anaerobic toluene catabolic pathway in denitrifying bacteria. *J. Bacteriol.* **183**: 4288-4295.
- Leutwein, C. & Heider, J., (2002)** (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA dehydrogenase of *Thauera aromatica*, an enzyme of the anaerobic toluene catabolic pathway. *Arch. Microbiol.* **178**: 517-524.
- Li, L. & Marsh, E.N., (2006)** Mechanism of benzylsuccinate synthase probed by substrate and isotope exchange. *J. Am. Chem. Soc.* **128**: 16056-16057.
- Li, L., Patterson, D.P., Fox, C.C., Lin, B., Coschigano, P.W. & Marsh, E.N., (2009)** Subunit structure of benzylsuccinate synthase. *Biochemistry* **48**: 1284-1292.
- Lippert, M.-L., (2009)** Biochemie von Enzymen des anaeroben Stoffwechsels von Toluol in *Thauera aromatica*. Dissertation, Technische Universität Darmstadt.
- Lovern, M.R., Cole, C.E. & Schlosser, P.M., (2001)** A review of quantitative studies of benzene metabolism. *Crit. Rev. Toxicol.* **31**: 285-311.
- Lovley, D.R. & Lonergan, D.J., (1990)** Anaerobic Oxidation of Toluene, Phenol, and *p*-Cresol by the Dissimilatory Iron-Reducing Organism, GS-15. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1858-1864.
- Mechichi, T., Stackebrandt, E., Gad'on, N. & Fuchs, G., (2002)** Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria degrading aromatic compounds under denitrifying conditions, and description of *Thauera phenylacetica* sp. nov., *Thauera aminoaromatica* sp. nov., and *Azoarcus buckelii* sp. nov. *Arch. Microbiol.* **178**: 26-35.
- Morasch, B., Schink, B., Tebbe, C.C. & Meckenstock, R.U., (2004)** Degradation of *o*-xylene and *m*-xylene by a novel sulfate-reducer belonging to the genus *Desulfotomaculum*. *Arch. Microbiol.* **181**: 407-417.
- Müller, J.A., Galushko, A.S., Kappler, A. & Schink, B., (1999)** Anaerobic degradation of *m*-cresol by *Desulfobacterium cetonicum* is initiated by formation of 3-hydroxybenzylsuccinate. *Arch. Microbiol.* **172**: 287-294.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H., (1986)** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. In: Cold Spring Harb Symp Quant Biol. pp. 263-273.
- Murray, M.G. & Thompson, W.F., (1980)** Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* **8**: 4321-4325.
- Musat, F., (2015)** The anaerobic degradation of gaseous, nonmethane alkanes - From *in situ* processes to microorganisms. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **13**: 222-228.
- Musat, F., Galushko, A., Jacob, J., Widdel, F., Kube, M., Reinhardt, R., Wilkes, H., Schink, B. & Rabus, R., (2009)** Anaerobic degradation of naphthalene and 2-methylnaphthalene by strains of marine sulfate-reducing bacteria. *Environ. Microbiol.* **11**: 209-219.
- O'Brien, J.R., Raynaud, C., Croux, C., Girbal, L., Soucaille, P. & Lanzilotta, W.N., (2004)** Insight into the mechanism of the B12-independent glycerol dehydratase from *Clostridium butyricum*: preliminary biochemical and structural characterization. *Biochemistry* **43**: 4635-4645.
- Pelzmann, A., Ferner, M., Gnida, M., Meyer-Klaucke, W., Maisel, T. & Meyer, O., (2009)** The CoxD protein of *Oligotropha carboxidovorans* is a predicted AAA+ ATPase chaperone involved in the biogenesis of the CO dehydrogenase [CuSMoO<sub>2</sub>] cluster. *J. Biol. Chem.* **284**: 9578-9586.
- Pester, M., Brambilla, E., Alazard, D., Rattei, T., Weinmaier, T., Han, J., Lucas, S., Lapidus, A., Cheng, J.-F.F., Goodwin, L., Pitluck, S., Peters, L., Ovchinnikova, G., Teshima, H.,**

- Detter, J.C., Han, C.S., Tapia, R., Land, M.L., Hauser, L., Kyrpides, N.C., Ivanova, N.N., Pagani, I., Huntmann, M., Wei, C.-L.L., Davenport, K.W., Daligault, H., Chain, P.S., Chen, A., Mavromatis, K., Markowitz, V., Szeto, E., Mikhailova, N., Pati, A., Wagner, M., Woyke, T., Ollivier, B., Klenk, H.-P.P., Spring, S. & Loy, A., (2012) Complete genome sequences of *Desulfosporosinus orientis* DSM765T, *Desulfosporosinus youngiae* DSM17734T, *Desulfosporosinus meridiei* DSM13257T, and *Desulfosporosinus acidiphilus* DSM22704T. *J. Bacteriol.* **194**: 6300-6301.
- Peters, F., Shinoda, Y., McInerney, M.J. & Boll, M., (2007) Cyclohexa-1,5-diene-1-carbonyl-coenzyme A (CoA) hydratases of *Geobacter metallireducens* and *Syntrophus aciditrophicus*: Evidence for a common benzoyl-CoA degradation pathway in facultative and strict anaerobes. *J. Bacteriol.* **189**: 1055-1060.
- Qiao, C. & Marsh, E.N., (2005) Mechanism of benzylsuccinate synthase: stereochemistry of toluene addition to fumarate and maleate. *J. Am. Chem. Soc.* **127**: 8608-8609.
- Rabus, R., Kube, M., Heider, J., Beck, A., Heitmann, K., Widdel, F. & Reinhardt, R., (2005) The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch. Microbiol.* **183**: 27-36.
- Rabus, R., Nordhaus, R., Ludwig, W. & Widdel, F., (1993) Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1444-1451.
- Rabus, R. & Widdel, F., (1995) Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* **163**: 96-103.
- Rabus, R., Wilkes, H., Behrends, A., Armstroff, A., Fischer, T., Pierik, A.J. & Widdel, F., (2001) Anaerobic Initial Reaction of n-Alkanes in a Denitrifying Bacterium: Evidence for (1-Methylpentyl)succinate as Initial Product and for Involvement of an Organic Radical in n-Hexane Metabolism. *J. Bacteriol.* **183**: 1707-1715.
- Raynaud, C., Sarçabal, P., Meynial-Salles, I., Croux, C. & Soucaille, P., (2003) Molecular characterization of the 1,3-propanediol (1,3-PD) operon of *Clostridium butyricum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 5010-5015.
- Reichard, P., (1997) The evolution of ribonucleotide reduction. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 81-85.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R., (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Schachter, D. & Taggart, J.V., (1953) Benzoyl coenzyme A and hippurate synthesis. *J. Biol. Chem.* **203**: 925-934.
- Selesi, D., Jehmlich, N., Bergen, M.v., Schmidt, F., Rattei, T., Tischler, P., Lueders, T. & Meckenstock, R.U., (2009) Combined Genomic and Proteomic Approaches Identify Gene Clusters Involved in Anaerobic 2-Methylnaphthalene Degradation in the Sulfate-Reducing Enrichment Culture N47. *J. Bacteriol.* **192**: 2953-2966.
- Selmer, T. & Andrei, P.I., (2001) *p*-Hydroxyphenylacetate decarboxylase from *Clostridium difficile*. A novel glycyl radical enzyme catalysing the formation of *p*-cresol. *Eur. J. Biochem.* **268**: 1363-1372.
- Selmer, T., Pierik, A.J. & Heider, J., (2005) New glycyl radical enzymes catalysing key metabolic steps in anaerobic bacteria. *Biol. Chem.* **386**: 981-988.
- Seyfried, B., Glod, G., Schocher, R., Tschech, A. & Zeyer, J., (1994) Initial reactions in the anaerobic oxidation of toluene and *m*-xylene by denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4047-4052.

- Snider, J., Gutsche, I., Lin, M., Baby, S., Cox, B., Butland, G., Greenblatt, J., Emili, A. & Houry, W.A., (2006) Formation of a distinctive complex between the inducible bacterial lysine decarboxylase and a novel AAA+ ATPase. *J. Biol. Chem.* **281**: 1532-1546.
- Sofia, H.J., Chen, G., Hetzler, B.G., Reyes-Spindola, J.F. & Miller, N.E., (2001) Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Res.* **29**: 1097-1106.
- Stadtman, T.C., (1996) Selenocysteine. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 83-100.
- Strijkstra, A., Trautwein, K., Jarling, R., Wöhlbrand, L., Dörries, M., Reinhardt, R., Drozdowska, M., Golding, B.T., Wilkes, H. & Rabus, R., (2014) Anaerobic activation of *p*-cymene in denitrifying betaproteobacteria: methyl group hydroxylation versus addition to fumarate. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**: 7592-7603.
- Studier, F.W. & Moffatt, B.A., (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-130.
- Szaleniec, M. & Heider, J., (2016) Modeling of the Reaction Mechanism of Enzymatic Radical C-C Coupling by Benzylsuccinate Synthase. *Int. J. Mol. Sci.* **17**.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J., (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.
- Toyama, H., Anthony, C. & Lidstrom, M.E., (1998) Construction of insertion and deletion *mx* mutants of *Methylobacterium extorquens* AM1 by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* **166**: 1-7.
- Trautwein, K., Kuhner, S., Wohlbrand, L., Halder, T., Kuchta, K., Steinbuchel, A. & Rabus, R., (2008) Solvent stress response of the denitrifying bacterium "*Aromatoleum aromaticum*" strain EbN1. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 2267-2274.
- Van Spanning, R.J., Wansell, C.W., De Boer, T., Hazelaar, M.J., Anazawa, H., Harms, N., Oltmann, L.F. & Stouthamer, A.H., (1991) Isolation and characterization of the *moxJ*, *moxG*, *moxI*, and *moxR* genes of *Paracoccus denitrificans*: inactivation of *moxJ*, *moxG*, and *moxR* and the resultant effect on methylotrophic growth. *J. Bacteriol.* **173**: 6948-6961.
- Verfürth, K., (2005) Untersuchungen zur Reaktion der Benzylsuccinat Synthase, des ersten Enzyms des anaeroben Toluol-Stoffwechsels. Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.
- Verfürth, K., Pierik, A.J., Leutwein, C., Zorn, S. & Heider, J., (2004) Substrate specificities and electron paramagnetic resonance properties of benzylsuccinate synthases in anaerobic toluene and *m*-xylene metabolism. *Arch. Microbiol.* **181**: 155-162.
- Vogel, T.M. & Grbic-Galic, D., (1986) Incorporation of oxygen from water into toluene and benzene during anaerobic fermentative transformation. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 200-202.
- Weelink, S.A., van Doesburg, W., Saia, F.T., Rijpstra, W.I., Roling, W.F., Smidt, H. & Stams, A.J., (2009) A strictly anaerobic betaproteobacterium *Georgfuchsia toluolica* gen. nov., sp. nov. degrades aromatic compounds with Fe(III), Mn(IV) or nitrate as an electron acceptor. *FEMS Microbiol. Ecol.* **70**: 575-585.
- Wilbrand, J., (1863) Notiz über Trinitrotoluol. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **128**: 178-179.
- Wöhlbrand, L., Jacob, J.H., Kube, M., Mussmann, M., Jarling, R., Beck, A., Amann, R., Wilkes, H., Reinhardt, R. & Rabus, R., (2013) Complete genome, catabolic sub-proteomes and key-metabolites of *Desulfobacula toluolica* Tol2, a marine, aromatic compound-degrading, sulfate-reducing bacterium. *Environ. Microbiol.* **15**: 1334-1355.

- Wöhlbrand, L. & Rabus, R., (2009)** Development of a Genetic System for the Denitrifying Bacterium '*Aromatoleum aromaticum*' Strain EbN1. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 41-52.
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z. & Graham, M.W., (1989)** Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**: 3469-3478.
- Zedelius, J., Rabus, R., Grundmann, O., Werner, I., Brodkorb, D., Schreiber, F., Ehrenreich, P., Behrends, A., Wilkes, H., Kube, M., Reinhardt, R. & Widdel, F., (2011)** Alkane degradation under anoxic conditions by a nitrate-reducing bacterium with possible involvement of the electron acceptor in substrate activation. *Environ. Microbiol. Rep.* **3**: 125-135.
- Zengler, K., Heider, J., Rosselló-Mora, R. & Widdel, F., (1999)** Phototrophic utilization of toluene under anoxic conditions by a new strain of *Blastochloris sulfoviridis*. *Arch. Microbiol.* **172**: 204-212.
- Zeyer, J., Kuhn, E.P. & Schwarzenbach, R.P., (1986)** Rapid microbial mineralization of toluene and 1,3-dimethylbenzene in the absence of molecular oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 944-947.



## IX. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin, Ampere
A.	<i>Aromatoleum</i> , <i>Azoarcus</i>
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
<i>bbs</i>	Operon für die $\beta$ -oxidation von (R)-Benzylsuccinat
<i>bla</i>	Gen für die $\beta$ -Lactamase
Bp	Basenpaare
Bq	Bequerel
BSA	bovine serum albumin
BSS	(R)-Benzylsuccinat-Synthase
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
<i>cat</i>	Gen für die Chloramphenicol-Acetyltransferase
Cm	Chloramphenicol
C-Terminal	Carboxyterminal
Da	Dalton
DFT	' <i>density function theoretical</i> ' (-Modell)
kDa	Kilodalton
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyrionuklease
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPR	' <i>Electron Paramagnetic Resonance</i> '-(Spektroskopie)
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> ; und andere
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
FAE	Fumarat-addierende Enzyme
g	Gramm, gravity (Erdbeschleunigung)
G	Guanin
GM	Grundmedium
h	Stunde
HPLC	high performance liquid chromatography
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
K	Kelvin
k	kilo ( $10^3$ )
Kan	Kanamycin
kBp/kB	Kilobasenpaare
Konz.	Konzentration
l	Liter
M	Molarität, Mega ( $10^6$ )
m	Meter, milli ( $10^{-3}$ ), messenger
mRNA	messenger RNA
min	Minute

---

mV	Millivolt
μ	micro (10 <sup>-6</sup> )
n	nano (10 <sup>-9</sup> )
<i>nptII</i>	Gen für die Neomycin-Phosphotransferase
N-Terminal	aminoterminal
OD <sub>578</sub>	optische Dichte bei 578 nm
Pa	Pascal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pK <sub>s</sub>	negative dekadischer Logarithmus der Säurekonstante K <sub>s</sub>
SDS	Natriumdodecylsulfat
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP	reversed-phase
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg
s	Sekunde
SAM	S-Adenosylmethionin
<i>sacB</i>	Gen für die Levansucrase
SECIS	Selenocystein-Insertions-Sequenz
Stlsg.	Stammlösung
T	Thymin
<i>T.</i>	<i>Thauera (aromatica)</i>
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
tRNA	transfer RNA
U	Uridin, Unit
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X x g	X-fache Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent

## X. Anhang

	61
<i>T. aromatica</i> K172	---MSDVQTLEYKKGKVVQFAPENPREAEIPADELHEHLQNPSTERTRRLKARCRCRWKHAHA
<i>T. aromatica</i> DNT-1	MNDIVSAKILEYKGTNLNFTPEDPAEAKIPADELHEHLQKPSTARTKRLKERCRCRWKHAHA
<i>T. aromatica</i> T1	MNDIVSAKVLEYKGGKLNFTPEDPAEETIPADELHEHLQKPSTARTKRLKERCRCRWKHAHA
<i>Azoarcus</i> sp. CIB	MNDIASAKVLEYKGTNLNFTPEDPAEAKIPSEDELHEHLQKPSTARTKRLKERCRCRWKHAHA
<i>A. aromatoleum</i> EbN1	---MTGAQTMEYKKGKVLQFTPENPAEADI PADELHEHLQNPSTERTRRLKARCRCRWKHAHA
<i>A. toluclasticus</i>	MNDIASAKVLEYKGNTRLRFTPENPAEAKIPADELHEHLQKPSTARTKRLKERCRCRWKHAHA
<i>Azoarcus</i> sp. T	MNDIASAKVLEYKGTNLNFTPEDPAEAKIPSEDELHEHLQKPSTARTKRLKERCRCRWKHAHA
<i>G. metallireducens</i>	--MSTVAASIKYNDKVVDFPLANQEENAIADVLHENLARPTTERTKRLKARCRCRWKHAHA
	121
<i>T. aromatica</i> K172	GEFCEKGVTAGIERMRLLTESHWATRGEPEPIRRAGHLKNILDKSTLVLQTDDEFIVGYHA
<i>T. aromatica</i> DNT-1	GEFIEKSVTAGIERMRYLTHEAHKASEGKPEAIRRALGLANVLNKSTLVLQDEDEFIVGYHA
<i>T. aromatica</i> T1	GEFIEKSVTAGIERMRYLTHEAHKASEGKPEAIRRALGLANVLNKSTLVLQDEDEFIVGYHA
<i>Azoarcus</i> sp. CIB	GEFIEKSVTAGIERMRYLTHEAHKASEGQPEVIRRALGLANVLNKSTLVLQDEDEFIVGYHA
<i>A. aromaticum</i> EbN1	GEFCEKGVTAGIERMRLLTESHWDRGKPEPIRRAGHLKNILDKCTLVLQPDDEFIVGYHA
<i>A. toluclasticus</i>	GEFIEKSVTAGIERMRYLTHEAHKASEGQPEAIRRALGLANVLNKSTLVLQDEDEFIVGYHA
<i>Azoarcus</i> sp. T	GEFIEKSVTAGIERMRYLTHEAHKASEGQPEVIRRALGLANVLNKSTLVLQDEDEFIVGYHA
<i>G. metallireducens</i>	GEFVDAEVRAGIERMRFITAHKASAGQPEVIRRALGLANILNKSTLVLQQDEFIIGYHA
	181
<i>T. aromatica</i> K172	EDPNMFPLYPELSYMAVQDYLSKSYSPQPAKEAQEIVDYWKPFSLQARCEPYFDPVDLHR
<i>T. aromatica</i> DNT-1	EDPNMFPLYPELSHMAVQDYLRSDYSPQPADEAAAINNEYWKPHSLQSKCQPYFDPADLGR
<i>T. aromatica</i> T1	EDPNMFPLYPELSHMAVQDYLRSDYSPQPADEAAAINNEYWKPHSLQSKCQPYFDPADLGR
<i>Azoarcus</i> sp. CIB	EDPNMFPLYPELSHMAVQDYLRSDYSPQPADEAAAINDYWKPHSLQSKCQPYFDPADLGR
<i>A. aromaticum</i> EbN1	EDPNMFPLYPELSYMAVQDYLSKSYSPQPAKEAQEIVDYWKPFSLQARCEPYFDPVDLRR
<i>A. toluclasticus</i>	EDPNMFPLYPELSHMAVQDYLRSDYSPQPADEAAAINNEYWKPHSLQSKCQPYFDPADLGR
<i>Azoarcus</i> sp. T	EDPNMFPLYPELSHMAVQDYLRSDYSPQPADEAAAINDYWKPHSLQSKCQPYFDPADLGR
<i>G. metallireducens</i>	EDPEMFPLYPELAYMAVQDYLSYSPQKPEAAEINNEYWKYSMQAKGERYFTQEELLQ
	241
<i>T. aromatica</i> K172	GYQVSTIEGPVFATGNSIVPPYETVLEDGLQARIALAEKIEHARAEMEKFPWHAPSGL
<i>T. aromatica</i> DNT-1	MYQVSSMEAPSFASGNSIVPPYETVLEDGLLARIKLAEKHIAEAQADMSTFPWNGTKGL
<i>T. aromatica</i> T1	MYQVSSMEAPSFASGNSIVPPYETVLEDGLLARIKLAEKHIAEAQADMSTFPWNGTKGL
<i>Azoarcus</i> sp. CIB	MYQVSSMEAPPFASGNSIVPPYETVLEDGLLARIKLAEKHIAEAQADMSTFPWNGTKGL
<i>A. aromaticum</i> EbN1	GYQVSTIEGPVFASGNSIVPPYETILEDGLLARIALAEKNIEHARAEMEKFPWNAPTGL
<i>A. toluclasticus</i>	MYQVSSMEAPSFASGNSIVPPYETVLEDGLLARIKLAEKHIAEAQADMSTFPWDGTKGL
<i>Azoarcus</i> sp. T	MYQVSSMEAPPFASGNSIVPPYETVLEDGLLARIKLAEKHIAEAQADMSTFPWNGTKGL
<i>G. metallireducens</i>	MYQVSTMEAPGFATGNSISPPYETVLQDGLLKRIEMAHEKIEHAKREMOKIPWDATTGL
	301
<i>T. aromatica</i> K172	EWIDKIDNWKAMVIACKAVIAWARRHARLCKIVAHEFETDPKRKAELLEIADICQRMPEAE
<i>T. aromatica</i> DNT-1	DNIAKIDNWKAMVIACKAVISWARRQARLCRIVAENFETDPKRQAEELLEIADICHRIPAE
<i>T. aromatica</i> T1	DNIAKIDNWKAMVIACKAVISWARRQGRLCRIVAENFETDPKRQAEELLEIADICQRIPEAE
<i>Azoarcus</i> sp. CIB	DNIAKIDHWKAMVIACKAVISWARRQGRLCRIVAENFETDPKRQAEELLEIVADICHRVPAE
<i>A. aromaticum</i> EbN1	EWIDKIDNWEAMVIACKAVIAWARRHARLCKIVAERFETDPKRKAELLEIADICQRPVPAE
<i>A. toluclasticus</i>	DNIAKIDNWKAMVIACKAVISWARRQGRLCRIVAENFETDPKRQAEELLEIAEICHRIPEAE
<i>Azoarcus</i> sp. T	DNIAKIDHWKAMVIACKAVISWARRQGRLCRIVAENFETDPKRQAEELLEIVADICHRVPAE
<i>G. metallireducens</i>	DWIAKIDVWKAMIADAEVINWARRHARLAKIVAENFETNPARKEELLEIAEISHRVPAE
	361
<i>T. aromatica</i> K172	PARGLKDAMQSKWFTFLICHAIERYASGFAQKEDSLWPYYKASVIDKTFQPMEHKDAVE
<i>T. aromatica</i> DNT-1	PCKGLKDAMQAKFFFTFLICHAIERYASGYAQKEDTLWPYYKASVIDKKFQPMDHMGAVE
<i>T. aromatica</i> T1	PCKGLKDAMQAKFFFTFLICHAIERYASGYAQKEDTLWPYYKASVVDKKFQPMSHMDAVE
<i>Azoarcus</i> sp. CIB	PCKGLKDAMQAKFFFTFLICHAIERYASGYAQKEDTLWPYYKASVIDKKFQPMDHMGAVE
<i>A. aromaticum</i> EbN1	PARGLKDAMQAKWFTFLICHAIERYASGYAQKEDSLWPYYKASVIDKTFQPMEHKDAVE
<i>A. toluclasticus</i>	PCKGLKDAMQAKFFFTFLICHAIERYASGYAQKEDTLWPYYKASVVDKKFQPMSHMDAVE
<i>Azoarcus</i> sp. T	PCKGLKDAMQAKFFFTFLICHAIERYASGYAQKEDTLWPYYKASVIDKKFQPMDHMGAVE
<i>G. metallireducens</i>	PCKGLKDAFQAKWYTYLICHADRYASGYAQKEDEMLEPYYNISVKEKSFPMTHTDVVE

	421
<i>T. aromatica</i> K172	LIEMERLKVSEHGAGKSRA <del>YREIF</del> PGSNDLFILTLGGTNGDGSDACNDMTDAILEATKRI
<i>T. aromatica</i> DNT-1	LVEMERLKISEHGAGKSRA <del>YREIF</del> PGSNDLFILTVGGTNARGEDACNDMTDAILEAAKRI
<i>T. aromatica</i> T1	LVEMERLKISEHGAGKSRA <del>YREIF</del> PGSNDLFILTVGGTNAGGEDACNDMTDAILEAAKRI
<i>Azoarcus</i> sp. CIB	LVEMERLKISEHGAGKSRA <del>YREIF</del> PGSNDLFILTVGGTNAGGEDACNDMTDAILEAAKRI
<i>A. aromaticum</i> EbN1	LIEMERLKVSEHGAGKSRA <del>YREIF</del> PGSNDLFILTLGGTNGDGSDACNDMTDAILEAAKRI
<i>A. toluclasticus</i>	LVEMERLKISEHGAGKSRA <del>YREIF</del> PGSNDLFILTVGGTNAGGEDACNDMTDAILEAAKRI
<i>Azoarcus</i> sp. T	LVEMERLKISEHGAGKSRA <del>YREIF</del> PGSNDLFILTVGGTNAGGEDACNDMTDAILEATKRI
<i>G. metallireducens</i>	MVEMERLKISEHGAGKSRA <del>YREIF</del> PGSNDLFILTI <del>GGTKPGYVD</del> ACSDMTDAILEGARNI
	481
<i>T. aromatica</i> K172	RTTEPSIVFRYSKKNRAKTLRWVFECIRDGLGYPSIKHNELGVQQMLEMAKYSRNGNGAT
<i>T. aromatica</i> DNT-1	RTAEPSIVFRYSKKNREKTLRWVFECIRDGLGYPSIKHDEIGTEQMKEYAKFSLNGNGAT
<i>T. aromatica</i> T1	RTAEPSIVFRYSKKNREKTLRWVFECIRDGLGYPSIKHDEIGTEQMKEYAKFSLNGNGAT
<i>Azoarcus</i> sp. CIB	RTAEPSIVFRYSKKSREKTLRWVFECIRDGLGYPSIKHDEIGTAQMKEYAKFSLNGNGAT
<i>A. aromaticum</i> EbN1	RTTEPSIVFRYSKKNRAKTLRWVFECIRDGLGYPSIKNDLGIQQLLEMAKYSRNGNGVT
<i>A. toluclasticus</i>	RTAEPSIVFRYSKKNREKTLHWVFECIRDGLGYPSIKHDEIGTAQMKEYAKFSLNGNGAT
<i>Azoarcus</i> sp. T	RTAEPSIVFRYSKKSREKTLRWVFECIRDGLGYPSIKHDEIGTAQMKEYAKFSLNGNGAT
<i>G. metallireducens</i>	RTTEPSIVFRWHPVGREKTKRLVFECIRDGLGYPSIKHDVIGTEQLKYYSQFSKNNNGAT
	541
<i>T. aromatica</i> K172	PEEAHYWVNVLCM <del>SPGL</del> AGRRKAQKTRSEGGSAIFPAKLEITLNNGYDWSYADMQMGP
<i>T. aromatica</i> DNT-1	DEEAHNWVNVLCMSPGIHGRRK <del>TQKTR</del> SEGGGSIFPAKLEITLNDGYDWSYADMQLGPK
<i>T. aromatica</i> T1	DEEAHNWVNVLCMSPGIHGRRK <del>TQKTR</del> SEGGGSIFPAKLEISLNDGYDWSYADMQLGPK
<i>Azoarcus</i> sp. CIB	DEEAHNWVNVLCMSPGLHGRRK <del>TQKTR</del> SEGGSSVFPKLVLEITLNDGYDWSYADMQLGPK
<i>A. aromaticum</i> EbN1	PEEAHYWVNVLCM <del>APGV</del> AGRRKAQKTRSEGGSAIFPAKLEITLSNGYDWSYADMQMGP
<i>A. toluclasticus</i>	DEEAHNWVNVLCMSPGIHGRRK <del>TQKTR</del> SEGGGSIFPAKLEVALNDGYDWSYADMQLGPK
<i>Azoarcus</i> sp. T	DEEAHNWVNVLCMSPGLHGRRK <del>TQKTR</del> SEGGSSVFPKLVLEITLNDGYDWSYADMQLGPK
<i>G. metallireducens</i>	DDEAHYWGLVLCMSPGVCGRRK <del>THKTR</del> SEGGGSIFPAKMMEIVLADGFDWSYSGMQLGPH
	601
<i>T. aromatica</i> K172	TGYAKDFATFDQLWEAFRKQYQYAI <del>ALAIRCKDVSRTME</del> CRFLQMPFVSALDDGCMELGM
<i>T. aromatica</i> DNT-1	TGDLTSLKTFEDVWEAFREQYQYAINLCICTKDVSR <del>YFEQRFLQMPFVS</del> AIIDDGCMELGM
<i>T. aromatica</i> T1	TGDLSSLKSFEDVWEAFRKQYQYAINLCISTKDVSR <del>YFEQRFLQMPFVS</del> AIIDDGCMELGM
<i>Azoarcus</i> sp. CIB	TGELSSLKTFEDIWEAFRKQYQYAINLGISTKDVSR <del>YFEQRYLQLPFVS</del> AIIDDGCMEFGM
<i>A. aromaticum</i> EbN1	TGHAKDFATFDQLWEAFRKQYQYAI <del>ALAIRCKDVSRTME</del> CRFLQMPFVSALDDGCMELGM
<i>A. toluclasticus</i>	TGDLSSLKTFEDVWEAFRNQYQYAINLCISTKDVSR <del>YFEQRFLQMPFVS</del> AIIDDGCMELGM
<i>Azoarcus</i> sp. T	TGELSSLKTFEDIWEAFRKQYQYAINLGISTKDVSR <del>YFEQRYLQLPFVS</del> AIIDDGCMEFGM
<i>G. metallireducens</i>	TGDPTTFKTFEQLWEAFRSQYAYATSKVIRAKDIMRYESKFLQMPFVSSIDDGCMELGI
	661
<i>T. aromatica</i> K172	DANALSEQPNG <del>WHNP</del> TTIVAGNSLVAIKKLIYDEKKYTMAQLMDALQANWEGYEEMRRD
<i>T. aromatica</i> DNT-1	DACALSEQPNG <del>WHNP</del> TTIVAANS <del>SLVAIKKLVFEEKKYTLEQLS</del> QALKANWEGFEEMRVD
<i>T. aromatica</i> T1	DACALSEQPNG <del>WHNP</del> TTIVAANS <del>SLVAIKKLVFEEKKYTLEQLS</del> QALKANWEGFEEMRVD
<i>Azoarcus</i> sp. CIB	DACALSEQPNA <del>WHNEV</del> TTIVAANS <del>SLVAIKKLVFEEKKYTLEQLS</del> QALKANWEGFEEMRVD
<i>A. aromaticum</i> EbN1	DANALSEQPNG <del>WHNP</del> TTIVAGNSLVAIKKLIYDEKKYTMEQLMDALKANWEGYEEMRRD
<i>A. toluclasticus</i>	DACALSEQPNG <del>WHNP</del> TTIVAANS <del>SLVAIKKLVFEDRKYTLEQLS</del> QALKANWEGFEEMRVD
<i>Azoarcus</i> sp. T	DACALSEQPNA <del>WHNEV</del> STIVAANS <del>SLVAIKKLVFEEKKYTLEQLS</del> QALKANWEGFEEMRVD
<i>G. metallireducens</i>	DSMELSEQPNG <del>WHNP</del> TTIVAANS <del>SLVAIKKLIYDEKKYTMAQLV</del> TALRANWHGYEDMRQD
	721
<i>T. aromatica</i> K172	FKNAPKWGNDDDDADVLSRFYEEI <del>LGEMMK</del> NINYSGGPVKPTG <del>QAVGLY</del> MEVGSRTGP
<i>T. aromatica</i> DNT-1	FKRAPKWGNDDDYADGIITRFYEEI <del>IGGEMR</del> KITNYSGGPVMP <del>TGQAVGLY</del> MEVGSRTGP
<i>T. aromatica</i> T1	FKRAPKWGNDDDYADGIITRFYEEI <del>IGGEMR</del> KITNYSGGPVMP <del>TGQAVGLY</del> MEVGSRTGP
<i>Azoarcus</i> sp. CIB	FKRAPKWGNDD <del>EYADS</del> IVSRFYEEVIGGELRKITNYSGGPVLP <del>TGQAVGLY</del> MEVGSRMGP
<i>A. aromaticum</i> EbN1	FKNAPKWGNDDDA <del>ADTL</del> ISRFYEEI <del>LGEMMK</del> NINYSGGPVKPV <del>GQAVGLY</del> MEVGSRTGP
<i>A. toluclasticus</i>	FKRAPKWGNDDDYADNIITRFYEEI <del>IGGEMR</del> KITNYSGGPVMP <del>TGQAVGLY</del> MEVGSRTGP
<i>Azoarcus</i> sp. T	FKRAPKWGNDD <del>EYADS</del> IVSRFYEEVIGGELRKITNYS <del>GAPVLP</del> TG <del>QAVGLY</del> MEVGSRMGP
<i>G. metallireducens</i>	FLNAPKWGNDD <del>EYADT</del> I <del>IKKFYEDI</del> IGGEMAKITNYSGGPVLPV <del>GQAVGLY</del> MEIGSRTGP
	781
<i>T. aromatica</i> K172	TPDGRFGGEAADDGGISPYSGTDKKGPTAVLR <del>SVSKVQKNQKANLLNQRLS</del> VPIMRSKHG
<i>T. aromatica</i> DNT-1	TPDGRFGGEAADDGGISPYMGTDKKGPTAVLR <del>SVSKVQKNQKANLLNQRLS</del> VPIMRSKHG
<i>T. aromatica</i> T1	TPDGRFGGEAADDGGISPYMGTDKKGPTAVLR <del>SVSKVQKNQKANLLNQRLS</del> VPIMRSKHG
<i>Azoarcus</i> sp. CIB	TPDGRFGGEAADDGGISPYMGTDKKGPTAVLR <del>SVSKVQKNQKANLLNQRLS</del> VPIMRSKHG
<i>A. aromaticum</i> EbN1	TPDGRFGGEAADDGGISPYSGTDKKGPTAVLR <del>SVSKVQKNQKANLLNQRLS</del> VPIMRSKHG
<i>A. toluclasticus</i>	TPDGRFGGEAADDGGISPYMGTDKKGPTAVLR <del>SVSKVQKNQKANLLNQRLS</del> VPIMRSKHG
<i>Azoarcus</i> sp. T	TPDGRFGGEAADDGGISPYMGTDKKGPTAVLR <del>SVSKVQKNQKANLLNQRLS</del> VPIMRSKHG
<i>G. metallireducens</i>	TPDGRFGGDAGDDGGISPYMGTDKKGPTAVLKS <del>SVSKVQKNQKANLLNQRLS</del> VPIMRSVHG

		841
<i>T. aromatica</i> K172	FDIWHAYMDTWHDNLNIDHVQFNVVSTEEEMKAAQREPEKHQDLIVRV	SGFSARFVDIPTYG
<i>T. aromatica</i> DNT-1	FEIWN SYMKTWHDNLNIDHVQFNVVSTDEMRAAQREPEKHHD LIVRV	SGYSARFVDIPTYG
<i>T. aromatica</i> T1	FEIWN SYMKTWHDNLNIDHVQFNVVSTDEMRAAQREPEKHHD LIVRV	SGYSARFVDIPTYG
<i>Azoarcus</i> sp. CIB	FEIWNAYMKTWHELNIDHVQFNVVSTDEMRAAQREPEKHND LIVRV	SGYSARFVDLPTYG
<i>A. aromaticum</i> EbN1	FDIWHAYMDTWHELNIDHVQFNVVSTEEEMKAAQREPEKHQDLIVRV	SGFSARFVDIPTYG
<i>A. toluclasticus</i>	FEIWN SYMKTWHDNLNIDHVQFNVVSTDEMRAAQREPEKHHD LIVRV	SGYSARFVDIPTYG
<i>Azoarcus</i> sp. T	FEIWNAYMKTWHELNIDHVQFNVVSTDEMRAAQREPEKHS D LIVRV	SGYSARFVDLPTYG
<i>G. metallireducens</i>	FTIWKS YMDAWEKLNIDHVQFNCVSTAEMKAAQKEPEKHQDLIVRV	SGFSARFVDIPTYG
		865
<i>T. aromatica</i> K172	QNTIIARNEQNFN AQDLEFLNVEL	
<i>T. aromatica</i> DNT-1	QNTIIARQE QDFSASDLEFLNVEI	
<i>T. aromatica</i> T1	QNTIIARQE QDFSASDLEFLNVEI	
<i>Azoarcus</i> sp. CIB	QNTIIARQE QDFSASDLEFLNVEI	
<i>A. aromaticum</i> EbN1	QNTIIARNEQDFN AQDLEFLNAEL	
<i>A. toluclasticus</i>	QNTIIARQE QDFSASDLEFLNVEL	
<i>Azoarcus</i> sp. T	QNTIIARQE QDFSASDLEFLNVEI	
<i>G. metallireducens</i>	QNTIIARNEQAFGADDLEYLNTQL	

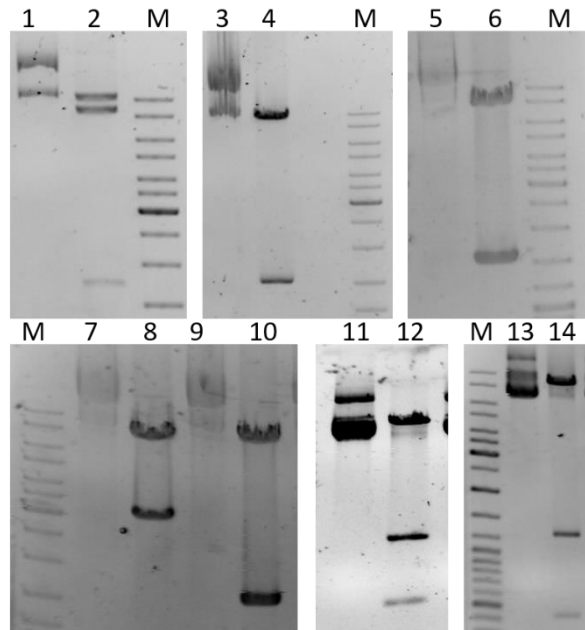
**Abbildung 32:** Alignment der Aminosäuresequenzen mehrerer BssA-Enzyme aus den  $\beta$ -Proteobakterien *Thauera*, *Azoarcus* und *Aromatoleum* und dem metallreduzierenden  $\delta$ -Proteobakterium *Geobacter metallireducens*. Rot hervorgehoben sind einige als Schlüsselaminosäuren für die Substratbindung identifizierte Aminosäuren (V185, E189, Y197, A309, Y381, I384, F385, L492, C493, A495, R508, E510, S513, W613, N615, I617, I620, Q707, V709, L711, S828, G829, Y830).

		59
BssA	MSDVQ-----TLE-YK GKVVQFAPENPREAEI PADELHEHLQNPSTERTRR--L	
IbsA	-MALQ-----SVK-YRGKDVNYMPANPAEADI PADELHEHLANPSTPR TAR--L	
HbsA	-----MPTVATPTTERTAR--L	
MnsA	---IS-----TLLNREALKVS YWKEVKMQKNVALN--ICEETPGSTGRVQF--L	
AssA1	-----MVAEPAQDQSVQELEDKQEWVV-----AEKKRSKR LDY	
MasD	MTATSTLSKTD LKNCETVEELRENQQWWWL-----AERERSAR LDY	
		119
BssA	KARCRWKHAAAG EFCEKGVTAGIERMRLLTESHWATRGEPEPI RRAHGLKNILDKSTLVL	
IbsA	KARCRWKHTSAG EFCEKGVVRAGIDRMRLITEAHKQSEGKPEVIRRALGLKNILDKMTIVV	
HbsA	KNRCRFKHVAGGEYVHAGVRAGVERARLITQSHKENVGEPNCIARARGLEKILKNITIH I	
MnsA	YDRCRWKHVAGGMYMRPEVKVG IARARLLTEAYKETRGES EMIRRAKGLDHILENYPIFI	
AssA1	LRKSIWKKGALGGNYAPGIKLDLECATLFTDMWKFWKYDPIMMRAKAI AHVLDKKTIFI	
MasD	LRKATWKKGALGGNYFDGIRLDLEYPTLFTEAWKKYPNDPSMLRRAKATAYVLDNISIFI	
		179
BssA	QTDEFIVGYHAEDPNMFPLYPELSYMAVQDY LKSK--YS---PQPAKEAQEIVDYWKPF S	
IbsA	QQDEFIIGHNAEDPNMFPLYPELSNLATQD FLMSD--YA---PQPVDEGTEINDYWRQHS	
HbsA	QDDELIVGANTEHPDYFPMYPELSYFATVDMVESQ--YC---DH-KDEMREIAEYWRPYT	
MnsA	NDDELIVGDAGENPD TLAIFPEMGFFPTIDIVEDPELMN---DDIRDEARDIAEWWKPMG	
AssA1	TDHAQLVGYFGSLPNTIMWRVDGAS MVNEEAYNEPGIMPEPENESLQKVAELNDYWAGQT	
MasD	TDSAQLVGYVGSAPHTIAWRVDGASTVNSEVYNEPGIHAEP EAESLKKVAEINSYWNQGT	
		239
BssA	LQARCEPYFDPVDLHRGYQVSTI-EGPVFATGYN SVIPPYETVLEDGLQARIALAEEKIE	
IbsA	LQAKCMSYFDPVDLARMFKFSSM-ESPPFVSAYNSIVPPYETVLEDGLLARIKLAEGNIA	
HbsA	IQTGKEYFTPEEIGVMYSATTV-QPPMFVTAESSIVPTYEAVLEDGLIKRIEEVEKKIA	
MnsA	LQDKCMPYYDPHEIDISTPWTIV-DVPPFVANYSVCPAYMSVLEDGLGRIKTEENIA	
AssA1	AVDKVARILDPEDAVKFLSGAIGWCAPSSAYGYS GKDYEYLFAGRRGFEDIIEINAAIE	
MasD	AVDKVGR LIDPEDAVKFFS GAIGWGT PSSAFGYS GKNFEYFMKGDRAFSQIIAEIDEKID	

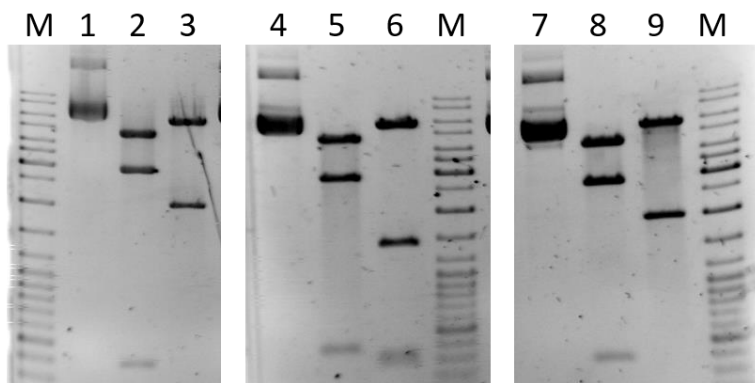
		299
BssA	HARAEMEKFPWHAPSGLEWIDKIDNWKAMVIACKAVIAWARRHARLCKIVAEHFET----	
IbsA	HAKEEMGKFPWDGTKGLVWLDKIDNWEAMI IACKAVIAWARRHARMCRIVAENFET----	
HbsA	DANAEMRKSPWNGQENLHYLDKIDQWNAMLIAMKAVVAWAQRYARLAKIMAENFLT----	
MnsA	KAFVKLRAYPWNGPENMPLMDKIDVWRSMIVADKAVIKWARRYSRLAKI I AENFDLSDSV	
AssA1	KAEDK--TVGVPGPEILDIYDRLQNWDA MILVLEAGIRHAKRYARLARTMAENMET----	
MasD	EAEEA--TIGTPSPHILPLYDKLNNWHAMKLVLEAAIRFAGRYARLARVMAA-KET----	
		359
BssA	--DPKRKAELLEIADICQRM PAEPARGLKDAMQSKWFTFLICHAIER YASGFAQKEDSL	
IbsA	--DPKRQTEELLEIAEICQRI PAEPCKGLKDAFQAKWFTFLICHSLERYASGFAHQEDKLL	
HbsA	--DPKRKEELLEIADICRHVPAYPARGLKDAMQSKWFTYLLCHSIERYSSGYGQKEDKML	
MnsA	LGAEKRKNELLEISD ICQRM PAEPAGFKDAMQSKWFVYLVCHSLERYSSGYAHLEDRLM	
AssA1	--DEKRREELLKIAETCERV PARAPRN LQESLQYDHF IQIFART-EAHEGAWPARPDYYH	
MasD	--DEQRKKELLRVAETCERV PANPPRN LQESLQYEHFVQVLARY-EAHEGAWPSRPDYYH	
		419
BssA	WPYYKASVIDKTFQPM EHKDAVELIEMERLKVSEHGAGKSRAYREIFPGSNDLFILTLGG	
IbsA	WPYYKASVIDRTAQPMTRKEAVEWVEMERLKVSEHGSGKSRAYREAFPGAGDLYIVTIGG	
HbsA	WPYFQKS VIEKTEQPM TREEAVELFECERLKVSEHGSTKGRQLREFFAGSNDLFILTLGG	
MnsA	WPYYKASVIDSTAQPM TREDAIELIECERLKVGERGVAKGRAHREGQPGANDLHIITLGG	
AssA1	GPYYDKDVN--VDKTLTKEDALDLVGEFMIRAYEVGGFAPRWAREGLQGITGTWVWTLGG	
MasD	GPLYAKDVE--VEKNIT ESEAIDL VGEYMIRCSEYGSFSPRYMRGLQGVGTGTFWVWTLGG	
		479
BssA	TNGDGSDACNDMTDAILEATKRIRTTEPSIVFRYSKKNRAKTLRWVFECIRDGLGYPSIK	
IbsA	TKDGSDACNDMTDAILEAAKRIRTTEPSIVFRYSKKNRPETLRLVFECIRDGLGYPSIK	
HbsA	INPDGSDASNDCTNCILEAASSIVTTEPSISFRWNEIGNIETKKRVFDCVKKGFGPSIK	
NMSS	LDEHGNDACNDLTDAILEASLSVRTPEPSLGFRYSPKINEKTRRLVFENIAQGFGPSIK	
AssA1	VNKDGSDACNDLTVAFLQAARLVRVSNPTFGFRWHPKVKDEVLR ECFECIRHGLGYPSMR	
MasD	VNQDGTDACNGMTIAL LKAARLVRVANPTFGFRWHPKVSNEVLRECFECIRQGLGYPTLR	
		539
BssA	HNELGVQQMLEMAKYSRNGNGATPEEAHYWVNVLCMAPGLAGRRKAQKTRSEGGSAIFPA	
IbsA	NDDIGTAQMLEYSKYSLNGNGATPEEAHDWANVLCMSPGLVGRRKTQKTRSEGGGIGIFPA	
HbsA	NDELNTQQLVKYFNV-----PEEVARDWALVLCMSPGITGRRGTQKTRSEGGSDVYPA	
MnsA	HEEKNTRQMIEHYKV-----PPDEAAHWALVLCMAPGVGKRRGLQKTETEGGGLIWID	
AssA1	NDPLLIQNAMHWHGH-----PLEEARTWVHQACMSPCPTTKHGVQPMRMASA-TANCA	
MasD	NDPVLIQNTMHWYGH-----PLEEARTWVHMACMSPNPTTKHGTSPFRMASA-TMNSA	
		599
BssA	KLLEITLNNGYDWSYADMQMG PETGYAKDFATFDQLWEAFRKQYQYAIALAIRCKDVSRT	
IbsA	KIFEISLTNGYDWSYSDFMG PETGDARNFTA FEELWEAFRKQYQYAIALCIRAKDVSRH	
HbsA	KVMEIALTNGFDEFFTNIQLGPETGNGEDFKSFDEVWNAVKLQLRYAIELSLRSKDVGRI	
MnsA	KCCELAFYDGFDSFANIQTGPKTG DATKFKT FEELFAAFEKQVEFATALHYRHKDVTRR	
AssA1	KMVEYALHNGYDHV-VGMQMG PETGDAKFHDFEDLFQAWVKQMEWLTSLLVRTVNLGRY	
MasD	KTIEYVLHNGYDRV-VNMQMG PKTGDAREIKDFEDL FERWTVQLKWL MNLLVRTVNLGRF	
		659
BssA	MECRFLQMPFVSALDDGCMELGMDANA-LSEQPNGWHNPITS-IVAGNSLVAIKKLIYDE	
IbsA	FEGKYIQMPFVSAIDGCMELGMDANV-LSEQPNGWHNPITN-IVAANS LVAIKKLIFDE	
HbsA	MESKYLCCPFISSIDGCEVKGMDANE-LAEVANPWHNVIGGSVVVIDSMAAIKKLVFED	
MnsA	AEIKFIESPFVASLDDACMDDGVGAFV-DKTYPNPWNNTPEGE-QAAADSLAAVKKLVFDD	
AssA1	KDPEFFGRPF LSGMSERSVESGLDVVSPVGD RGNCVVTAF TW-VENIDSLAAVKKLVFDD	
MasD	KDPEFFGRPF LSAITERAVEHGIDAVSPEGERGNAVTAF TW-IENVDSMAAIKKLVFDD	

		719
BssA	KKYTMAQLMDALQANWEGYEEMRRDFK-NAPKKGNDDDADVLISRFYEEILGGEMMKNI	
IbsA	KRYTMAQLLEALQANWEGYEEMRQDFK-NAPKKGNDSSYCDEIVTRFFEDVIGGEMAKIT	
HbsA	KKYTMAELMDALRNNWEGKEEMRLDFW-NAPKFGND DAYADEIASKYYD-LIAD EWKRNT	
MnsA	KKYTMEDVNVAMKADFKGYEEMRKDML-AAPKKGND DPYVDEIGGRVFT-MVADKLLEQT	
AssA1	KKYTMEQLLTALKANWDGYEEMRLDFVNNAPKKGND DDYVDDIMLRCLRET-ARHSRVMK	
MasD	KKYTMSQLIDALEAEWDGYEQMRLDFVKNPKKGND DDYVDDIMLRCLLSVA-AEHSRNIQ	
		779
BssA	NYSGGPVKPTGQAVGLYMEVGSRTGPTPDGRFGGEAADDGGISPYSGTDKKGPTAVLRSV	
IbsA	NYSGGPVLPGQAVGVYMEIGARTGPTPDGRFGGEAADDGGISPYMGTDKKGPTAVLRSV	
HbsA	TYSGTYPPLAQSVAGYIVNGPKTAATANGRHAGEALDDGGCSPYMGCDKSGPTAVLKS	
MnsA	TYSGMHPLGNPQTVSTFATRAPRVGALPFGRSHGEVLHDGGSSPYVGLDKKGPTAVLKS	
AssA1	CPSGNSWPILPENVS GNIHYASIVGALPNRRRGDALYDGGISPGPGLDKKGPSAVLKSC	
MasD	CTSGNCWPILPENVS GNIHYANIVGALPNRRRGDALYDGGVSPGPGLDKAGPTAVLKSV	
		839
BssA	SKVQKN--QKANLLNQRLSVPIMRSKHGFDIWHAYMDTWHDLNIDHVQFNVVSTEEMKAA	
IbsA	SKVQKN--QKANLLNQRLSVPIMRSTHGFNIWKAYMDTWHDLNIDHVQFNVLSTEEMRAA	
HbsA	SKIDAS-KHKGILLNQRLSTVLMNSDAGFDLWHAYMKTWHS LGIDHVQFNVISQEDMKAA	
MnsA	AHIPFD-RYKGVQFNQRLPVSVMRGDKGFQIWTAYMKA WHDLNIDHVQFNVVDTKDMIEA	
AssA1	GKIDHVS DGRAFLNQRLSPTQLAGEKGYQLWKAYIRTWADLGLDHVQFNMVSDETLRAA	
MasD	GKIDHVNQGRSFLNQRLSPTQLAGDKGFQLWNSYVRTWAE LGIDHIQFNVISDKVLRAA	
		891
BssA	QREPEKHQDLIVRVSGFSARFVDIPTYGQNTIIARNEQNFNAQDLEFLNVEL	
IbsA	QREPEKHQDLIVRVSGYSARFVDLPTFGQNTIIARHEQEFSGEDMEFLNVDL	
HbsA	QIEPEKYDTLVRIAGYS AKFIDLARYSQDTIIARTEQDMAG-----	
MnsA	QKEPEKWQSLIVRIAGYSARFVSLPKNAQDAIIARTEQPLS-----	
AssA1	QKDPEKYSEVIVRVAGYSAHFVDISRKTQDNIIQRTVQGI-----	
MasD	QNDPEGYQEIVRVAGYSAHFIDISRKTQDNIIQRTVQGLG-----	

**Abbildung 33:** Alignment zwischen den katalytischen Untereinheiten der BSS-orthologen Fumarat-addierenden Enzyme Isopropylbenzylsuccinat-Synthase (IbsA), Hydroxybenzylsuccinat-Synthase (HbsA), Methylnaphtylsuccinat-Synthase (MnsA) und den Alkansuccinat-Synthasen AssA1 und MasD. Rot hervorgehoben sind mögliche Schlüsselaminosäuren (V185, E189, Y197, A309, Y381, I384, F385, L492, C493, R508, E510, S513, W613, N615, I617, I620, Q707, V709, L711, S828, G829, Y830).

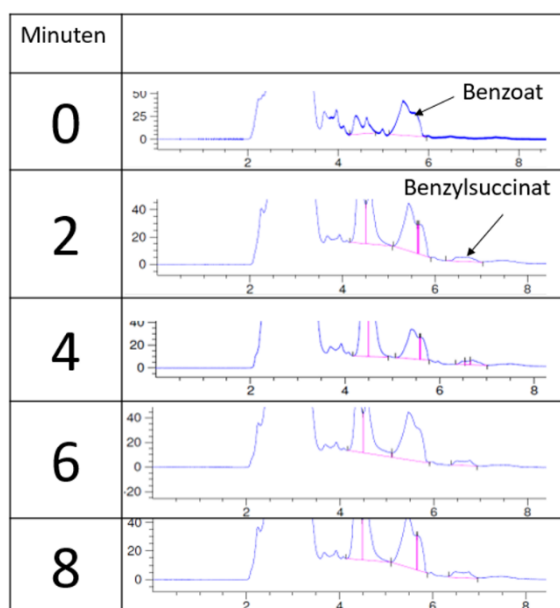


**Abbildung 34:** Restriktionsverdau der hergestellten Plasmide aus Tabelle 21. 1: pASGbssstrepCys489SecUAG #6 unv., 2: pASGbssstrepCys489SecUAG #6 + XbaI, 3: pASGbssstrepCys489SecUGA #1/1 unv., 4: pASGbssstrepCys489SecUGA #1/1 + XbaI, 5: pASG3bssstrepIle620Gln unv., 6: pASG3bssstrepIle620Gln + EcoRI, 7: pASG3bssstrepIle620Val unv., 8: pASG3bssstrepIle620Val + EcoRI, 9: pASG3bssstrepIle620Val unv., 10: pASG3bssstrepIle620Val + EcoRI, 11: pASG3bssstrepArg508Lys unv., 12: pASG3bssstrepArg508Lys BamHI, 13: pASG3bssstrepArg508Gln unv., 14: pASG3bssstrepArg508Gln BamHI, M: GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific, MA, USA).



**Abbildung 35:** Restriktionsverdau der hergestellten Plasmide aus Tabelle 22. 1: pK19mobsacB-DBdel unv., 2: pK19mobsacB-DBdel + KpnI, 3: pK19mobsacB-DBdel + PvuI, 4: pK19mobsacB-Opdel unv., 5: pK19mobsacB-Opdel + KpnI, 6: pK19mobsacB-Opdel + PvuI, 7: pK19mobsacB-EHdel unv., 8: pK19mobsacB-EHdel + KpnI, 9: pK19mobsacB-EHdel + EcoRI, M: GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific, MA, USA).





**Abbildung 36:** Zeitabhängige Bildung von (*R*)-Benzylsuccinat. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und in der HPLC auf Produktbildung überprüft.

**Tabelle 23:** Auswertung von Abbildung 25. Zu den Spuren 1 – 15 ist der jeweils aufgetragene Klon (Genotyp) und das zur Überprüfung verwendete Oligonukleotidpaar definiert. Für das jeweilig verwendete Oligonukleotidpaar sollte bei einer PCR das entsprechende Fragment in Basenpaaren (Bp.) für eine *Up*- bzw. *down*-Integration erhalten werden. + und – geben an, ob das zu erwartende Fragment tatsächlich erhalten wurde und in Abb. 25 sichtbar wird.

Genotyp	Oligonukleotidpaar	Spur	<i>Up</i> -Integration		<i>Down</i> -Integration	
pK19mobsacB-DBdel-Integration	P28+P29	1	9793	-	1915	+
	P30+P31	2	1367	-	1367	-
	P28+P32	3	2580	-	6194	-
	P29+P33	4	1848	+	xxx	-
pK19mobsacB-Opdel-Integration	P28+P29	5	9852	-	1915	+
	P30+P31	6	1367	+	9304	-
	P28+P32	7	2639	-	10444	-
	P29+P33	8	1848	+	xxx	-
	P30+P32	9	xxx	+	1432	-
	P31+P33	10	10312	-	2507	-
pK19mobsacB-EHdel-Integration	P28+P29	11	1915	+	1915	+
	P30+P31	12	1367	+	9205	-
	P28+P32	13	7046	-	10464	-
	P30+P32	14	xxx	+	1452	-
	P31+P33	15	5806	-	2388	+

## **XI. Danksagung**

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Johann Heider für das überaus spannende aber auch herausfordernde Thema. Seine Geduld und stets große Diskussionsbereitschaft haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Wolfgang Buckel für die Bereitschaft zur Erstellung des Zweitgutachtens für diese Arbeit, für wertvolle Ratschläge innerhalb und außerhalb von Laborseminaren und für die sehr erfolgreiche Zusammenarbeit als Koautoren bei der Veröffentlichung der Daten.

Prof. Dr. Bernard T. Golding, Dr. Peter Friedrich, Dr. Maciej Szaleniec und Dr. Markus Hilberg danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit als Koautoren. Ganz besonders herzlich danke ich Dr. Peter Friedrich für die Synthese des chiralen Toluols und für die gute und angenehme Zusammenarbeit bei der Durchführung wichtiger Experimente und meinem Vorgänger und Mentor Dr. Markus Hilberg für die Einführung in das Thema.

Ein großer Dank geht an Prof. Dr. Antonio Pierik für die Durchführung der EPR-spektroskopischen Analysen und viele hilfreiche Ratschläge.

Bei Dr. Karola Schühle bedanke ich mich für die stets große Hilfsbereitschaft im Laboralltag mit vielen besonders wertvollen Ratschlägen, bei Marco Hornung für die Hilfe beim Umgang mit der HPLC.

Meinen Kollegen Lina, Enrico, Kathi, Daniel, Georg, Nil, Gabi und Iris und allen Kollegen aus der Mikrobiologie danke ich für die angenehme Atmosphäre und die schöne Zeit innerhalb und außerhalb des Laboralltags.

Ich danke meiner Mutter für die Unterstützung im Studium, der Promotion und in allen Belangen meines Lebens. Außerordentlich danke ich meiner Freundin Lina für ihre große tatkräftige, aber besonders moralische Unterstützung in schlichtweg allem.

## **XII. Erklärung**

Ich versichere, dass ich meine Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

---

(Datum)

---

(Unterschrift)